

**Transkutane Messung der Mikrozirkulation bei Frühgeborenen
und reifen Neugeborenen mittels der
Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung (OPS)**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Julia Halbfaß, geb. Strötgen

aus
Frankfurt/ Main

2010

**Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des
Klinikums Großhadern
Abteilung Neonatologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieze**

**Transkutane Messung der Mikrozirkulation bei Frühgeborenen
und reifen Neugeborenen mittels der
Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung (OPS)**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München**

**vorgelegt von
Julia Halbfaß, geb. Strötgen
aus
Frankfurt/ Main
2010**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. O. Genzel- Boroviczény

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Uwe Kreimeier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
--------------------	----------

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Aufbau der Haut	8
1.2 Mikrozirkulation in der Haut des Neugeborenen	9
1.3 Methoden zur Erfassung der Mikrozirkulation der Haut	11
1.3.1 Intravitalmikroskopie (IVM)	11
1.3.2 Laser- Doppler- Angiographie/ Fluxmetrie (LDF)	12
1.3.3 Konfokale Laser- Raster- Mikroskopie (CLSM)	14
1.3.4 Nahe- Infrarot- Photoplethysmographie (NIRS)	15
1.3.5 Kapilläre Füllungszeit	15
1.4 Orthogonal Polarisierter Spektralbildgebung (OPS/ Cytoscan™ A/R) als Alternative zu den bisherigen Methoden	16

<u>2. Fragestellung und Zielsetzung</u>	19
--	-----------

<u>3. Material und Methoden</u>	21
--	-----------

3.1 Studiendesign	
3.1.1 Einschlusskriterien	21
3.1.2 Ausschlusskriterien	21
3.1.3 Applikation der Lichtquelle	22
3.1.4 Zeitpunkt der Messungen	22
3.1.5 Im Rahmen der Studie gemessene Parameter	22

3.1.6 Aus den Patientenakten entnommene Parameter	23
3.1.6.1 Status bei Geburt	23
3.1.6.2 Laborwerte	23
3.1.6.3 Weitere Parameter im Verlauf des Untersuchungszeitraums	24
3.2 Material	
3.2.1 Geräte	24
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	24
3.2.3 Computerprogramme	25
3.2.4 Versuchsaufbau	26
3.2.5 Einverständniserklärung	26
3.3 Methoden	
3.3.1 Funktionsschema der Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung (Cytoscan TM A/R)	27
3.3.2 Versuchsablauf	29
3.3.2.1. Bedingungen	29
3.3.3 Auffinden einer geeigneten Messstelle	31
3.3.4 Eigenschaften des Cap- ImageTM- Programms zur Auswertung der Videosequenzen	32
3.3.4.1 Bestimmung der Gefäßdurchmesser (Diam)	33
3.3.4.2 Bestimmung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten (RBC Vel)	35
3.3.4.3 Bestimmung der funktionellen Gefäßdichte (FCD)	35
<u>4 Statistische Auswertung</u>	35

<u>5 Ergebnisse</u>	36
5.1 Lokalisation der am besten geeigneten Messstelle	38
5.3 Parameter der Mikrozirkulation	39
<u>6 Diskussion</u>	
6.1 Ergebnisse der Auswertung der Mikrozirkulationsaufnahmen	45
6.1.1 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten	45
6.2 Mikrozirkulation der Haut bei Reifgeborenen	47
6.3 Mikrozirkulation der Haut bei Frühgeborenen	48
6.4 Vergleich der Daten von Reifgeborenen und Frühgeborenen	49
6.5 Anwendungsmöglichkeiten der Methode im klinischen Alltag	49
6.6 Risiken der Anwendung des Verfahrens bei Früh- und Neugeborenen	51
6.7 Stärken und Limitationen	51
6.8 Einfluss von Artefakten und Störfaktoren	52
6.8.1. Beeinflussung der Messungen durch Hautfalten und Lanugobehaarung	52
6.8.2 Druck-und Bewegungsartefakte	52
<u>7 Zusammenfassung</u>	54
<u>8 Literaturverzeichnis</u>	56
<u>9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</u>	65
<u>10 Danksagung</u>	66

Abkürzungen

µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
CCD	Charged Couple Device (engl.), Halbleiterdetektor mit der Fähigkeit, Licht in eine Punktmatrix umzuwandeln und die Helligkeitswerte der einzelnen Punkte als digitales Signal wiederzugeben
CLSM	Confocal laser scanning microscopy (engl.)
cm	Zentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CRP	C- reaktives Protein
Dia(m)	Gefäßdurchmesser
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	Englisch
etc.	et cetera (lat.) und so weiter
FCD	Funktionelle Kapillardichte
FiO ₂	Inspiratorische O ₂ - Konzentration
g/dl	Gramm/ Deziliter
h	Stunde/ Stunden
Hb	Hämoglobinkonzentration
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
i.v.	Intravenöse Verabreichung
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
lat.	lateinisch
LDF	Laser- Doppler- Fluxmetrie
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natrium Chlorid, Kochsalz
NIRS	Nah-Infrarot- Spektroskopie
nm	Nanometer
O ²	Sauerstoff
OPS imaging	orthogonal polarisation spectral imaging/ orthogonal polarisierte spektrale Bildgebung
PEEP	positiv endexpiratorischer Druck
pH	pondus hydrogenii (lat.), Abkürzung für Potenz und Maß für Wasserstoffkonzentration/ $-\log[H^+]$
PIP	positiver Inspirationsdruck
p- Wert	probability (engl): Wahrscheinlichkeit
r	Korrelationskoeffizient
RBC	red blood cells (engl.) rote Blutzellen, Erythrozyten
RR	Blutdruck (nach Riva-Rocci)
RR diast	Diastolischer arterieller Blutdruck
RR syst	Systolischer arterieller Blutdruck
s	Sekunde
T	Messzeitpunkt
Temp	Temperatur
Vel	Velocity (engl.) Blutzellgeschwindigkeit
vs	versus (lat.) entgegen/ gegenübergestellt
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen. Bei einem Erwachsenen beträgt die Gesamtfläche im Schnitt ca. 1,5-2 m², abhängig von Größe und Gewicht des Individuums. Bei einem reifen Neugeborenen beträgt die Größe der Hautoberfläche nur ca. 1/10 davon, also etwa 0,2-0,25 m². Aufgabe der Haut ist es, den menschlichen Organismus vor schädigenden äußeren Einflüssen mechanischer, chemischer oder thermischer Art sowie vor Infektionserregern zu schützen sowie den Wasser- und Wärmeaustausch des Körpers zu regulieren. Zudem ist die Haut ein wichtiges Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Berührung, Schmerz, Hitze und Kälte.

Der Aufbau der Haut ist in 3 Schichten unterteilt: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis.

Die Epidermis entstammt dem Ektoderm und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten; daneben sind Merkel- Zellen, Melanozyten, Langerhans- Zellen und Lymphozyten in wesentlich geringerer Zahl vorhanden. Zusätzlich kommen Nerven vor. Gefäße finden sich hier jedoch nicht. Die Oberfläche des Ektoderm besteht in der 6. Gestationswoche aus 2 Schichten: Basalzellen und oberflächliche peridermale Zellen. Die peridermale Schicht löst sich zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft ab und trägt zur Bildung der Vernix caecosa, die das Neugeborene umgibt, bei. In der 11. bis 15. Gestationswoche beginnt zudem ein Reifeprozess, die Verhornung der Epidermis.

Die Dermis ist das unterhalb der Epidermis gelegene Bindegewebe, das sich in die Tiefe bis zum subkutanen Fett erstreckt. Die Hauptkomponenten sind Zellen und Bindegewebsfasern, eingebettet in eine gelartige Grundsubstanz. Die Dicke der Dermis ist sehr variabel in Abhängigkeit der Lokalisation. Die Dermis enthält ein ausgedehntes System von Blutgefäßen. Es sind zwei parallel zur Haut oberfläche gelegene Plexus, ein tiefer dermaler und ein oberflächlicher subpapillärer Plexus, zu unterscheiden. Der tiefe dermale Plexus besteht aus kleinen bis mittelgroßen Arterien und Venen und verläuft an der Grenze zur Subkutis. Er gibt viele zur Oberfläche verlaufende Arteriolen ab. Diese Arteriolen versorgen den subpapillären Plexus, aus dem in jede Dermispapille Schlingen ziehen. Jede Dermis- Papille enthält beim

Erwachsenen demnach Papillarschlingen von 0,2-0,4 mm Länge. Zusätzlich kommen in der Dermis im Bereich der Akren noch arteriovenöse Anastomosen vor, die eine Umgehung der Kapillaren ermöglichen. Damit kann der Blutdurchfluss reguliert werden. Neben der metabolischen Versorgung von Dermis und Epidermis dient dieses Gefäßsystem der Temperatur- und Blutdruckregulation des Körpers (2, 43).

1.2 Mikrozirkulation in der Haut des Neugeborenen

Mikrozirkulation bezeichnet die Blutzirkulation in der terminalen Blutbahn oder Endstrombahn- die Arteriolen, Kapillaren und Venolen- der Organe, die die nutritive Versorgung des Gewebes sichert.

Die Mikrozirkulation der Haut des Neugeborenen ist einer der wichtigsten Parameter in der Intensivmedizin zur Erfassung des Gesamtzustandes des Kindes, da z.B. Entzündungsparameter, insbesondere bei Frühgeborenen, oft erst verspätet ansteigen. Im Falle einer beginnenden Infektion oder Sepsis wird daher auf eine Reihe unspezifischer klinischer Zeichen, wie Veränderungen des Hautkolorits, der kapillären Füllungszeit, Trinkunlust, Veränderungen des Atemmusters bis hin zu Apnoen etc., geachtet. Eine möglichst frühzeitige Erkennung erster Anzeichen einer Infektion ist dabei auch für die Prognose des Kindes entscheidend. Die Möglichkeiten, den Kreislauf an eine Veränderung der hämodynamischen Bedingungen anzupassen, beschränken sich im Säuglingsalter zum einen auf eine Steigerung der Herzfrequenz, die jedoch bei bereits hoher Ausgangsfrequenz im Vergleich zum Erwachsenen nur begrenzt gesteigert werden kann. Zum anderen erfolgt eine Anpassung durch eine Vasokonstriktion peripher gelegener Gefäße, so zum Beispiel der Hautgefäße.

Typischerweise kommt es zur Zentralisation mit kühlen Extremitäten und verminderter Kapillardurchblutung. Dies geschieht in erster Linie zur Sicherung der lebenserhaltenden Funktionen durch Perfusion des Herzmuskels, der Nieren und des Gehirns.

Ein Abblassen oder eine Marmorierung der Haut können somit erste Zeichen für eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes und in Kombination mit Tachykardie und erniedrigtem Blutdruck Hinweis auf ein eingeschränktes Herzzeitvolumen sein.

In vielen Fällen ist dieses klinische Zeichen zunächst das einzige Signal einer Verschlechterung.

Studien zufolge enthält die Epidermis sowie Dermis im 3. Gestationsmonat noch keine nachweisbaren Blutgefäße (69, 77, 91). Die Epidermis, die zu diesem Zeitpunkt aus einer Schicht von 2 Zellen besteht, wird durch Diffusion aus einem gelatinösen Bett proliferierender mesenchymaler Zellen ernährt. Ab etwa der 13. Gestationswoche, also zu Anfang des 4. Gestationsmonats, sind erstmals Blutgefäße in der Dermis erkennbar. Diese sind auf die Versorgung epithelialer Strukturen ausgerichtet, insbesondere in Bereichen epithelialer Verdickung zur Produktion der Adnexe (Haare, Nägel, Schweißdrüsen).

Im Verlauf des 4. Gestationsmonats beginnt die Differenzierung der oberflächlichen Kapillarnetze der Haut in erkennbare Arterien und Venen. Etwa ab der 34. Gestationswoche ist die Entwicklung der Epidermis in utero abgeschlossen (43). Kurz nach der Geburt wird die Haut durch ein dichtes subepidermales Netz an Gefäßen versorgt, dessen Muster relativ geringe regionale Unterschiede aufweist. Selbst in der mittleren und tiefen Dermis findet sich nun eine ausgeprägte Gefäßversorgung (74).

Das Gefäßverteilungsmuster mit Kapillarschlingen und subpapillären venösen Plexus, wie man es in der ausgereiften Haut vorfindet, ist bei Geburt noch nicht vorhanden. Mit Ausnahme der Handflächen, der Fußsohlen und des Nagelbettes, hat die Haut zum Zeitpunkt der Geburt fast keine Kapillarschlingen, sondern weist ein ungeordnetes Netz an Kapillaren auf. Am Ende der ersten Lebenswoche nimmt dieses Kapillarnetz dann geordnetere Formen an. Die Kapillarschlingen erscheinen ab der 2. Lebenswoche als kleine oberflächliche Erweiterungen oder Knospen. Geformte Kapillarschlingen finden sich in der Haut des Neugeborenen jedoch erst ab der vierten bis fünften Lebenswoche. Ab der 14. bis 17. Lebenswoche sind dann in allen Bereichen der Haut gut entwickelte Kapillarschlingen zu erkennen. Eine Abkühlung der Haut scheint diese Reifung zu fördern (43, 74). Die Struktur der Haut bei Neugeborenen unterscheidet sich noch beträchtlich von der eines Erwachsenen. Während bei letzterer die Anordnung der Kapillarschlingen regelmäßig orthogonal zur Oberfläche der Haut verlaufen, zeigt sich in der Haut des Neugeborenen eine eher horizontale Anordnung,

die bereits durch die dünnen oberen Schichten zu erkennen ist. Die Haut des Neugeborenen erscheint daher rötlich. In den Hautfalten bilden sich geordnete subpapilläre Plexus und Kapillarschlingen im Vergleich zu den übrigen Hautarealen verzögert aus (69).

1.3 Methoden zur Erfassung der Mikrozirkulation in der Haut

Zu den bisher angewandten Methoden zur Erfassung der Mikrozirkulation zählten die Intravitalmikroskopie und die Laser- Doppler- Angiographie, die wiederum keine qualitative Erfassung der Mikrozirkulation darstellt, sondern lediglich eine Flußänderung quantitativ erfassen kann. Eine neuartige Methode stellt auch die konfokale Laser- Raster- Mikroskopie dar. Durch diese Methode, die ebenso wie die Intravitalmikroskopie nur unter Verwendung fluoreszierender Farbstoffe durchgeführt werden kann, können in- vivo Bilder mit höherer optischer Auflösung erzeugt werden als mit den bisher gängigen Methoden.

Als herkömmliche Methode zur qualitativen Erfassung der Mikrozirkulation sei hier auch auf die Ermittlung der kapillären Füllungszeit hingewiesen, die in Sekunden angegeben wird. Diese stellt jedoch eine unsichere Methode zur Erfassung der Mikrozirkulation dar, die nicht zum quantitativen Vergleich herangezogen werden kann.

1.3.1 Intravitalmikroskopie (IVM)

Die Intravitalmikroskopie bezeichnet ein Verfahren, das die Mikrozirkulation im lebenden Organismus sichtbar macht. Sie ermöglicht die Untersuchung zahlreicher mikrozirkulatorischer Parameter wie Gefäßbreite, Kapillardichte oder Blutfluss. Besondere Bedeutung hat die Intravitalmikroskopie erlangt durch ihre Fähigkeit, die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel in Echtzeit sichtbar zu machen. Die Mechanismen der Adhäsionskaskade können so visuell dargestellt und untersucht werden. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie ist das Wissen um die Vorgänge der Leukozytenadhäsion in der Mikrozirkulation in den letzten Jahren immens

angewachsen. Sie ist das Mittel der Wahl für die Untersuchung der in vivo-Leukozytenadhäsion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Das Prinzip der Intravitalmikroskopie besteht darin, mit einem Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop in ein Gewebe hineinzufokussieren, wobei je nach Gewebe eine unterschiedliche Eindringtiefe erreicht werden kann. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein- Isothiocyanat) angefärbten zellulären Blutbestandteile wie Erythrozyten oder Leukozyten können dann in den Gefäßen dargestellt werden.

Da für dieses Verfahren das Aufsetzen des Mikroskopes auf das entsprechende Organ oder Gewebe notwendig ist, ist es beim Menschen nur begrenzt einsetzbar, beispielsweise am Nagelbett. Weitere mögliche Messorte waren Lippen, Zunge oder Zahnfleisch sowie das Auge (Konjunktiven). Auch Versuche an Neugeborenen wurden bereits beschrieben (63-67). Schon die Notwendigkeit eines Fluoreszenzfarbstoffes schränkt die Anwendung in der Neonatologie jedoch deutlich ein. Im Tierversuch hingegen können verschiedenste Organe operativ exponiert werden und so der Intravitalmikroskopie zugänglich gemacht werden.

1.3.2 Laser- Doppler- Angiographie/ Fluxmetrie (LDF)

Die Laser Doppler Fluxmetrie wurde erstmalig von Riva et al. 1972 verwendet, um den Fluss in kleinen Gefäßen aufzuzeichnen. Ähnlich wie bei der herkömmlichen Dopplermessung mit Hilfe von Schallwellen basiert die Technik auf dem von Christian Doppler (1803-1853) beschriebenen Prinzip der Frequenzverschiebung von reflektierten Schallwellen durch sich bewegendende Teile. Bei der Laser Doppler Fluxmetrie wird monochromatisches, hochfrequentes Laserlicht über einen Lichtleiter (Glasfaser) zur Haut geleitet und dort diffus gestreut. Das an den sich bewegendenden Erythrozyten reflektierte und phasenverschobene Licht wird über einen Photodetektor erfasst und in ein elektrisches Laser- Doppler- Signal umgewandelt. In die als „Flux“ bezeichnete Messgröße gehen hierbei Blutflussgeschwindigkeit und Volumen der sich im Messbereich befindlichen Teilchen ein; sie wird in arbiträren Einheiten (AU)

angegeben (Hiller und Albrecht 1991). Stern berichtete 1975 erstmals über eine Frequenzverbreiterung von aus der Haut reflektiertem monochromatischem Licht (82). Diese Doppler- Verschiebung resultiert aus der Interaktion der Photonen mit sich bewegendenden Gewebestrukturen, wobei die roten und weißen Blutzellen den weit überwiegenden Anteil darstellen. Das Laser Doppler Signal korreliert hierbei linear mit der Gewebepfusion, definiert als dem Produkt aus Gewebehämatokrit und mittlerer Partikelgeschwindigkeit (Nilsson et al.) Seit der Einführung der Laser Doppler Fluxmetrie in den Bereich der Mikrozirkulation wurde die Aussagekraft von Absolutwerten der Laser- Doppler - Fluxmetrie immer wieder von verschiedenen Autoren in Frage gestellt. Diese Skepsis begründet sich darin, dass Laser- Doppler- Messungen keine qualitativen Ergebnisse liefern können, sondern nur quantitative Aussagen über den Blutfluß im erfassten Messvolumen liefern. Desweiteren unterliegen die erfassten Absolutwerte einer großen interindividuellen Variabilität und sind schwer zu reproduzieren. Da die Methode jedoch in der Lage ist, den Blutfluss in einem kleinen Gewebevolumen kontinuierlich mit einer hohen zeitlichen Auflösung zu erfassen, können spontane Oszillationen im Blutfluss der Haut am Menschen nichtinvasiv und einfach dargestellt werden. Wie alle Untersuchungen, die auf dem Doppler-Prinzip beruhen ist jedoch auch das LDF- Signal extrem bewegungs- empfindlich. Sowohl Bewegungen der Messsonde selbst als auch solche der zu untersuchenden Oberfläche können Artefakte generieren. Zudem sollte keinerlei Druck, beispielsweise durch Aufsetzen der Glasfaser ausgeübt werden, da dies zu einer Verminderung der Gewebepfusion führen kann. Aufgrund der mangelnden Absolutwerte sowie der geringen Eindringtiefe von nur wenigen Millimetern ist eine Vergleichbarkeit der Daten erschwert. Zudem repräsentieren die Messungen hauptsächlich das von arteriovenösen Anastomosen emittierte Licht und nicht das von subpapillären Plexus der Haut, welche die nutritive Versorgung der Haut widerspiegeln.

1.3.3 Konfokale Laser- Raster- Mikroskopie (CLSM)

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) ist eine neuere mikroskopische Methode, die sich gegenüber der Durchlicht- und insbesondere gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie durch eine erhöhte optische Auflösung auszeichnet (neuere Systeme erreichen ein Auflösungsvermögen von ca. $0,25\mu\text{m}$). Sie ermöglicht die dreidimensionale Rekonstruktion aus einem zweidimensionalen Datensatz. Als Lichtquelle wird ein Laser (z.B. ein Argon-Krypton-Mischgaslaser) verwendet, der sich aufgrund seines linienförmigen Spektrums besser zur Herausfilterung einer für ein gegebenes Fluorochrom benötigten Anregungswellenlänge eignet (sofern diese Wellenlänge im Linienspektrum des benutzten Lasers vorkommt). Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, in der das Objektfeld als Ganzes ausgeleuchtet wird, wird bei der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie durch Einbringen einer Illuminationslochblende nur ein scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet und das Objektfeld "Punkt für Punkt" und Zeile für Zeile abgerastert. Dies führt zu weniger Streulicht aus benachbarten Objektbereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bildes. Das Einbringen einer zweiten - in ihrem Durchmesser veränderbaren Lochblende - in die aufnehmende Optik, die in die selbe Objektebene fokussiert wie die beleuchtende Optik (Prinzip der Konfokalität), bewirkt, dass Licht aus tieferen und höheren Objektebenen als der Fokusebene nicht zum Photomultiplier (oder einer CCD-Kamera) gelangt. Dies führt zu einer erheblichen Erhöhung der Bildschärfe durch Reduktion des sogenannten "out of focus blur" (Streulicht aus nicht im Fokus liegenden Ebenen) und ist die Voraussetzung für die Aquirierung von optischen Serienschnitten durch ein Präparat. Weiterhin sind umfangreiche digitale Bildbearbeitungsmöglichkeiten gegeben (simultane Rotationen um die drei Raumachsen, simultane Verschiebungen entlang der drei Raumachsen, Intensitätsmessungen, Intensitätsschwellenwert-Darstellungen, Histogramme, Operationen mit Konstanten sowie Bildern und vieles mehr). Grundsätzlich kann jede Markierung, die in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt wird, auch mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie verwendet werden.

Als nachteilig erweist sich jedoch auch hier die Notwendigkeit eines fluoreszierenden Farbstoffes. Somit findet diese Verfahren in der Neonatologie keine Anwendung.

1.3.4 Nahe- Infrarot- Photoplethysmographie/ Spektroskopie (NIRS/ NIRP)

Bei der nichtinvasiven NIRP-Methode (Nahe- Infrarot- Rot- Remissions-Photoplethysmographie) wird ein Clip, analog zum bekannten Pulsoxymeter, an einem peripheren Messort des Patienten angebracht (Finger- bzw. Großzehenbeere). Wird nun Licht des Nahe-Infrarot-Bereiches der Wellenlänge 840 nm in das Gewebe eingeleitet, so werden relativ große Gewebevolumina bei Eindringtiefen von ca. 3-4 mm illuminiert. Die entstehenden Rückstreuungssignale werden über einen Empfänger erfasst und diagnostisch bewertet. Es lassen sich mit diesem Licht die am speziellen Messort je Zeiteinheit passierenden (relativen) Mengen des Blutes ableiten, woraus Bewertungen der "Durchblutung" und gleichzeitig des Herzzustandes möglich sind. Dagegen kann mit der Rot-Wellenlänge von 640 nm die erfasste Blutmenge hinsichtlich ihrer Sauerstoffsättigung beurteilt werden (42). Zur Kontrolle der Temperatur am Messort ist ein entsprechender Sensor im Clip integriert.

Als Nachteil dieser Methode und Einschränkung der klinischen Anwendbarkeit gelten die fehlenden Möglichkeiten einer Eichung sowie die Tatsache, dass lediglich eine relative Änderung der Durchblutung mittels dieser Messungen erfasst wird. Ein Einsatz dieser Methode bei Früh- und Neugeborenen ist aufgrund des nichtinvasiven und schonenden Verfahrens möglich (42). Aufgrund der geringen Aussagekraft über die Qualität der Mikrozirkulation wird die Nahe- Infrarot- Spektroskopie jedoch nicht als gängiges Messinstrument im klinischen Alltag angewendet.

1.3.5 Kapilläre Füllungszeit

Die kapilläre Füllungszeit findet in der Pädiatrie zur Beurteilung der peripheren Mikrozirkulation weiterhin ihren Einsatz. Sie wird durch etwa 5 Sekunden anhaltenden Druck auf eine bestimmte Region wie z.B. die Stirn, das Sternum oder den Nagelpfalz und anschließende Beurteilung des Zeitintervalls bis zur Reperfusion

festgelegt. Der Endpunkt wird erreicht, wenn das zunächst abgeblasste Gewebe wieder die Farbe der umgebenden Haut angenommen hat. Dies wird in Sekunden gemessen. Normalwerte sind im Erwachsenenalter Zeiten von etwa 2 Sekunden.

Die kapilläre Füllungszeit wird durch die Umgebungstemperatur, die Umgebungsbeleuchtung sowie auch die Lokalisation am Körper mitbeeinflusst. Da die Bestimmung dieses Wertes jedoch von derart vielfältigen Faktoren beeinflusst wird, so auch von einem Untersucher zum nächsten variiert, kann er nur in Verbindung mit anderen Faktoren - wie z.B. die Herzfrequenz - zur Beurteilung des Gesamtzustandes des Patienten herangezogen werden (11).

1.4 Orthogonal Polarisierte Spektralbildgebung (Cytoscan TM A/R) als Alternative zu den bisherigen Methoden

Unter der Verwendung einer ähnlichen Grundtechnik wie zuvor von Slaaf et al. beschrieben, nach deren Berichten eine intravitalmikroskopische Technik mit zwei orthogonal Polarisatoren eingesetzt wurden, entwickelten Groner et al. ein tragbares Handgerät, das den Zugang zu einer Vielzahl von Gefäßbetten am Patienten ermöglichte (28, 32, 33, 34, 35). Die Technik der Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung (OPS) wurde in das CYTOSCAN A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A) integriert. Mit dieser neuen Technik, der Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung (OPS), können durch den Einsatz einer speziellen optischen Vorrichtung nichtinvasiv die mikrovaskulären Parameter bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um eine virtuelle Lichtquelle (Kaltlicht) mit einer Eindringtiefe von 0,5-1 mm im Gewebe im tierexperimentellen Versuch und 0,2 mm in vivo bei einer Wellenlänge von 548 nm (34). Diese Wellenlänge liegt im Absorptionsspektrum sowohl oxygenierten als auch desoxygenierten Hämoglobins. Das Licht wird vom Hämoglobin absorbiert, wodurch ein Bild erzeugt wird, bei dem sich Hb- tragende Strukturen vom übrigen Gewebe abheben.

Das Licht wird zunächst durch einen Polarisator geleitet. Das polarisierte Licht fällt auf einen Kippspiegel, von wo aus es um 90 Grad gedreht auf das Gewebe auftrifft und dort einerseits gestreut und dabei wieder depolarisiert und andererseits vom

Hämoglobin absorbiert wird. Das gestreute, depolarisierte Licht wird hinter dem Kippspiegel durch einen Analysator (orthogonalen Polarisator) geleitet, welcher die Strahlen wiederum polarisiert. Diese polarisierte Strahlung trifft auf die „Charge-Coupled-Device- (CCD-) Kamera. Nur die vom Analysator gefilterte, orthogonal-polarisierte Strahlung trägt somit letztendlich zur Bildgebung bei. Licht, das schon an der Oberfläche des Gewebes reflektiert wird und den Analysator noch polarisiert erreicht, wird hier herausgefiltert und ist nicht an der Bildgebung beteiligt (Abbildung 1). Die an der Bildgebung beteiligten Strukturen sind in einer handlichen Messvorrichtung eingearbeitet (Abbildung 3 und 4).

Auf einem Monitor kann der Ablauf der Messung währenddessen verfolgt werden. Es werden etwa 10- minütige Sequenzen auf VHS- Videobändern aufgezeichnet und zu einem späteren Zeitpunkt offline ausgewertet.

Das von der Firma Cytometrics entwickelte Prinzip der quantitativen Messung der Mikrozirkulation durch die orthogonal Polarisierter Spektralbildgebung (Cytoscan™ A/R) besitzt gegenüber den herkömmlichen Methoden mehrere Vorteile. Es ist nicht invasiv und wegen der Verwendung eines Kaltlichtes von 548 nm völlig unschädlich für den Menschen.

Auch kann auf den Gebrauch von Kontrastmitteln bei dieser Methode verzichtet werden. Aufgrund dieser Tatsachen kann diese Methode auch in der neonatologischen Intensivmedizin verwendet werden. Es kommt bereits in vielen Bereichen zum Einsatz, bisher jedoch nur zu Studienzwecken.

Die quantitativen Messungen der Gefäßdichte, des Gefäßdurchmessers und der Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten (RBC) durch das OPS- Verfahren wurden allesamt gegenüber der Fluoreszenz-Intravital- Mikroskopie am Model der dorsalen Hautfalte bei Hamstern und der Rattenleber validiert (33, 49).

Untersuchungsmodell¹

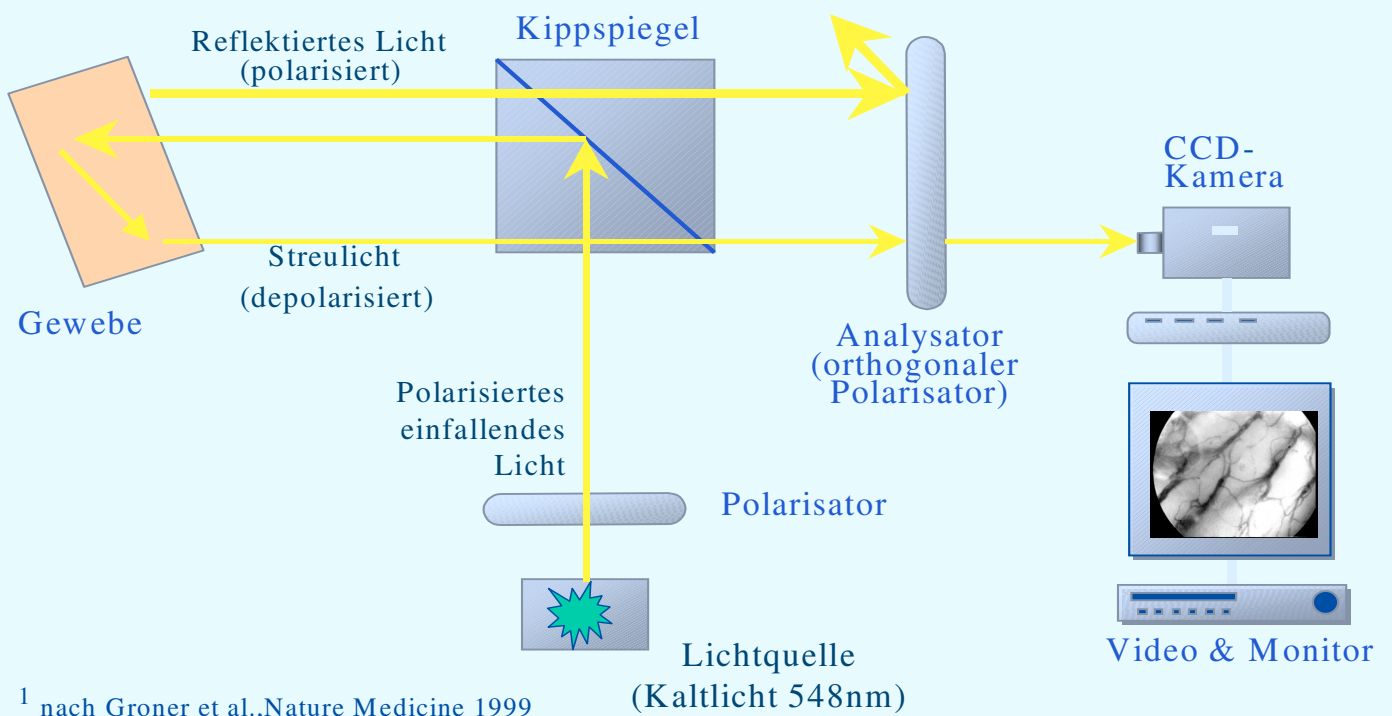


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des OPS- Gerätes

2 Fragestellung und Zielsetzung

Bisher ist wenig bekannt über die mikrovaskuläre Perfusion der Haut direkt nach Geburt. Das Herzminutenvolumen bezogen auf die Körperoberfläche ist beim Neugeborenen höher als beim Erwachsenen. Wegen des beim Neugeborenen anteilig hohen Herzminutenvolumens in Ruhe kann unter Belastung nur eine begrenzte Reserve ausgeschöpft werden, um das HMV weiter zu erhöhen. Der erforderliche Perfusionsdruck wird somit durch eine Umverteilung des geringen HMV und somit des Sauerstoffangebots zugunsten der Versorgung des Gehirns, des Herzens und der Nebennieren erzielt. Unter entspannten Bedingungen ist in der Haut bezogen auf deren Sauerstoffbedarf ein eher hoher Blutfluss vorhanden.

Die Beurteilung der Hautdurchblutung ist aus diesem Grunde von Bedeutung. Es gibt jedoch nur sehr unzureichende Daten zur Mikrozirkulation der Haut bei reifen Neugeborenen und kaum Daten bei Frühgeborenen.

Die Dichte der Hautdurchblutung wurde vor 1999 noch nie bei Neugeborenen mit In-vivo- Verfahren bestimmt. Die gängigen Methoden zur Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation bei Patienten beschränkten sich bisher auf Laser- Doppler- Flussbestimmung und die Kapillar- Videomikroskopie.

Die Kapillar- Videomikroskopie war bei Neugeborenen jedoch beschränkt auf die Messung im Gefäßbett des Nagelbettes der Kinder (69).

Die direkte Betrachtung des Gefäßbettes anderer menschlicher Organe war wegen der Notwendigkeit einer Gewebe- Durchleuchtung, einer Kontrastmitteldarstellung oder der Größe der zur Darstellung der Strukturen erforderlichen Messinstrumente deutlich erschwert oder sogar unmöglich.

Die Technik der von uns verwendeten OPS- Bildgebung wurde in das CYTOSCAN A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A) integriert und auf diese Weise Messungen sogar in Inkubatoren ermöglicht.

Ziel der Studie war es, zu überprüfen, ob eine Quantifizierung der Mikrozirkulation der Haut Früh- und Neugeborener durch Darstellung der Kapillaren, Venolen und Arteriolen in der Haut möglich ist. Voraussetzung war, eine hierfür geeignete Körperstelle zu ermitteln. Desweiteren untersuchten wir, ob dieses bildgebende Verfahren zur quantitativen in-vivo- Bestimmung der Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten, der Gefäßdurchmesser und der Gefäßdichte geeignet wäre. Somit war unser Ziel die Etablierung eines nichtinvasiven Untersuchungsverfahrens zur Datenerhebung zu Bestand und Verlaufkontrolle der Mikrozirkulation, in diesem Fall die Veränderung der Mikrozirkulation vom ersten zum fünften Lebenstag bei Früh- und Neugeborenen. Abschließend wird der Versuch unternommen, eine klinische Relevanz der Untersuchungsergebnisse mit Rückschluss auf die Gewebepfusion bezüglich der Therapie der Patienten festzustellen.

3 Material und Methoden

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine klinische prospektive (Kohorten-) Studie, in der 2 Gruppen von Patienten mittels einer neuartigen Methode untersucht wurden. Zuvor erfolgte nach Rücksprache mit dem behandelnden Arzt die Aufklärung der Eltern des Kindes und eine schriftliche Einverständniserklärung (Darstellung Graphik Unterpunkt 3.2.5).

Die Studienunterlagen wurden der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München vorgelegt und von dieser befürwortet. Die Untersuchungen entsprachen den Anforderungen der Deklaration von Helsinki.

3.1 Studiendesign

In einem Zeitraum von etwa 12 Monaten beginnend im Oktober 1999 wurden Früh- und Neugeborene konsekutiv am ersten und fünften Lebenstag untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Mikrozirkulation der Haut mit Hilfe des Cytoscan™ A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.) gemessen.

3.1.1 Einschlußkriterien

Als Einschlusskriterien wurden definiert:

- Schriftliche Einwilligung der Eltern
- Frühgeborene (24.- 36. Schwangerschaftswoche)
- Reifgeborene (37.- 41. Schwangerschaftswoche)

3.1.2 Ausschlußkriterien

- Verlassen der Klinik vor dem 5. Lebenstag
- Sehr dunkelhäutige Kinder (Hauttyp IV und höher)

3.1.3 Applikation der Lichtquelle

Nach dem Ausschluss ungeeigneter Körperstellen (Thorax, Abdomen Flanken, Kopf, Bein, Leistenregion sowie Hand- und Fußsohlen) wurden die Messungen schließlich bei beiden Gruppen an der Haut der Axilla und der Innenseite des Oberarmes durchgeführt. In den meisten Fällen konnte die Bildqualität durch die Verwendung von Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) deutlich verbessert werden. Die Verwendung von Babyöl oder Sonographiegel hat sich nicht bewährt. Das Öl erzeugte regelrechte „Schlieren“ in den Bildern und im Gel eingeschlossene Luftblasen störten die Optik.

3.1.4 Zeitpunkt der Messungen

Die Messungen wurden jeweils am 1. und am 5. Lebenstag des Kindes durchgeführt, wenn die Kinder gesättigt und zur Ruhe gekommen waren oder schliefen. Am besten geeignet waren die Abend- und Nachtstunden, da hier eine ruhige Atmosphäre herrschte.

3.1.5 Im Rahmen der Studie gemessene Parameter

- Datum und Zeitpunkt der Messung
- Aktuelles Gewicht bei Messung
- Beatmungsmodus mit Frequenz
- FiO_2 = Sauerstoffgehalt der Luft
- Herzfrequenz
- Blutdruck
- Kapilläre Füllungszeit
- Score*
- Qualität der Hautperfusion (Hautkolorit)
- Temperatur des Inkubators
- Temperatur des Kindes

Tabelle 1: Das Ausmaß der Mikrozirkulation wurde durch ein **Scoresystem** (Genzel et al.) beschrieben, das nach klinischen Gesichtspunkten die Beeinträchtigung der Hautperfusion Früh- und Neugeborener quantifiziert.

Score	0	1	2
Kalte Extremitäten	keine	Hände, Füße	Unterarm, Unterschenkel
Kapilläre Füllungszeit	< 2 sec.	> 2 sec.	> 3 sec.
Hautfarbe	normal	marmoriert	blass

Eingeschränkte Mikrozirkulation:

Ist, unabhängig vom Blutdruck, definiert durch einen Score > 3.

Maximal erreichbarer Punktwert 6, keine Beeinträchtigung 0

3.1.6 Aus den Patientenakten entnommene Parameter

3.1.6.1 Status bei Geburt

- Gestationsalter
- Geburtsgewicht
- Einlings- oder Mehrlingsgeburt
- Diagnosen, angeborene Erkrankungen

3.1.6.2 Laborwerte (sofern routinemäßig bestimmt)

- Hämatokrit
- Hämoglobin
- C- reaktives Protein (CRP)

3.1.6.3 Weitere Parameter im Verlauf des Untersuchungszeitraums

- Blutdruckwirksame Medikation
- Hilfsmittel bei der Messung (NaCl 0,9%, Babyöl, Sonographie-Gel)

Die Daten wurden auf einem Bearbeitungsbogen dokumentiert.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Die Anordnung der Geräte umfasste das Handstück der OPS- Messvorrichtung, das so genannte Cytoscan TM A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.), sowie eine in das Meßsystem integrierte CCD- Kamera (Costar CV- M 536 CCIR, JAI, Tokyo, Japan) das mit einem Monitor (Sony, PVM- 97, Tokyo, Japan) verbunden wurde. Zusätzlich bestand die Messeinheit aus einem PAL-Videorekorder der Marke Panasonic (Video- Cassette Recorder, AG- 7350, Osaka, Japan) und S- VHS- Videokassetten der Firma FUJIMAGNETICS GmbH (Kleve, Deutschland) zur Aufzeichnung jeweils etwa 10-minütiger Videosequenzen.

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Zu den Verbrauchsmaterialien zählten neben den für jedes Kind neu verwendeten sterilen Schutzkappen (Cytolens TM) aus durchsichtigem Kunststoff zur Gewährleistung hygienischer Untersuchungsbedingungen auch NaCl 0,9% bzw. Sonographiegel sowie Babyöl. Nach dem Gebrauch der Sonde wurde diese mit einem entsprechenden Desinfektionsmittel gründlich gereinigt und desinfiziert.

3.2.3 Computerprogramme

Cap- Image®™ (Dr. Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Germany)
Excel
Graph Pad Prism
Windows 2000
Word

3.2.4 Versuchsaufbau

3.2.5 Einverständniserklärung

Klinikum Großhadern
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Prof. Dr. Hermann Hepp

Klinikum Großhadern • Neonatologie • 81377 München
Marchioninistraße 15

Ludwig _ **LMU**
Maximilians __
Universität ____
München _____

Durchwahl:(089)70952803

Telefax: (089) 7095-2809

Einverständniserklärung

Liebe Eltern,

wir untersuchen derzeit in einer klinischen Studie Störungen der *Hautdurchblutung* bei kranken Früh- und Neugeborenen. Hierbei wird eine Methode angewendet, die für Ihr Kind völlig unbedenklich ist. Die Messungen werden bei Kindern mit Blutdruckproblemen oder Störungen der Hautdurchblutung durchgeführt, sowie bei Kindern mit Infektion oder einem Atemnotsyndrom (unreife Lunge) und gesunden Kindern als Kontrollgruppe

Wir würden uns daher sehr freuen, wenn Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme Ihres Kindes an unserer Studie geben würden.

Wir legen Ihrem Baby dabei einen kleinen *Meßfühler* auf die Haut. Aus diesem Sensor wird grünes Licht (Cytoscan) in das umliegende Gewebe abgegeben, das wenige mm tief eindringt. Das zurückkehrende Signal wird in einem Computer analysiert und gibt Aufschluß über die Hautdurchblutung und über die Gefäße und dem Blutfluß direkt unter der Haut. Am Ende der Messung werden noch die Hauttemperatur und der Blutdruck bei Ihrem Kind gemessen.

Die Untersuchung ist für Ihr Kind ohne Risiko und dauert ungefähr 10 bis 15 Minuten. Sie können selbstverständlich gerne dabei sein, wenn Sie dies wünschen. Bei einer Nichtteilnahme entstehen Ihnen und Ihrem Kind keine Nachteile. Sollten Sie noch weitere Fragen haben, so wenden Sie sich bitte an uns.

PD Dr. O. Genzel
Oberärztin der Neonatologie
Tel 7095 2808

Abbildung 2: Einverständniserklärung

3.3 Methoden

3.3.1 Funktionsschema der Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung

In die optische Vorrichtung des Gerätes ist eine Lichtquelle integriert, die monochromatisches Kaltlicht mit einer Wellenlänge von 548 nm emittiert, das innerhalb des Absorptionsspektrums sowohl von oxygeniertem als auch desoxygeniertem Hämoglobin liegt. Diese Wellenlänge ergibt sich aus einer Mittelung der optimalen Wellenlänge zur maximalen Eindringtiefe in das Gewebe sowie der maximalen Absorption durch Hämoglobin, um einen bestmöglichen Kontrast zu erzeugen. Es hat eine Eindringtiefe im tierexperimentellen Versuch von 1 mm, im Gewebe in vivo von 0,2 mm (33).

Bei der OPS- Bildgebung wird also eine virtuelle Lichtquelle erzeugt.

Das monochromatische Licht wird durch einen Polarisator geleitet. Das polarisierte Licht fällt auf einen halbdurchlässigen Kippspiegel, wo es um 90° gedreht auf das Gewebe auftrifft. Dort wird es zum einen Teil gestreut und dabei wieder depolarisiert, zum anderen Teil vom Hämoglobin absorbiert.

Das gestreute, depolarisierte Licht wird hinter dem Kippspiegel durch einen Analysator geleitet, der die Strahlen wieder polarisiert. Diese polarisierte Strahlung trifft auf die Charge- Coupled- Device- (CCD-) Kamera.

Nur die vom Analysator gefilterte, orthogonal- polarisierte Strahlung trägt letztendlich zur Bildgebung bei. Licht, welches schon an der Oberfläche des Gewebes reflektiert wird und den Analysator noch polarisiert erreicht, wird hier herausgefiltert und ist nicht an der Bildgebung beteiligt. Das durch das Gewebe reflektierte Licht wird durch Hämoglobin absorbiert und erzeugt so ein positives Bild der Gefäße vor negativem Kontrast mit einer Auflösung von 1 pixel => 1µm. Es werden also nur von Erythrozyten perfundierte Gefäße dargestellt. Auf dem angeschlossenen Monitor kann der Ablauf der Messung währenddessen verfolgt werden.

Es werden etwa 10- minütige Sequenzen auf VHS- Videobändern aufgezeichnet und später off- line ausgewertet. Da hierbei keine Kontrastmitteldarstellung erforderlich ist, kann dieses Verfahren problemlos beim Menschen angewandt werden.

Zur quantitativen Messung der Mikrozirkulationsparameter wurde dieses Verfahren bereits im Tiermodell im Vergleich zur Intravital- Fluoreszenz- Mikroskopie validiert (33).

Abbildung 4 zeigt das Messinstrument in einem Inkubator bei der Erzeugung einer Bildgebung bei einem Frühgeborenen der 24. SSW am ersten Lebenstag.



Abbildung 3: Messgerät Cytoscan A/R mit Basiseinheit und Haltevorrichtung für die OPS imaging- Sonde sowie eine externe Lichtquelle (weiß) aus Langer et al., 2000 Figure 4



Abbildung 4: Frühgeborenes 24 + 3 Schwangerschaftswoche am ersten Lebenstag bei einer Messung (Geburtsgewicht 550 g)

3.3.2 Versuchsablauf

3.3.2.1. Bedingungen

Die OPS- Bildgebung wurde jeweils am ersten und fünften Lebenstag der Frühgeborenen und Neugeborenen nach Einwilligung der Eltern durchgeführt.

Die Kinder wurden in einer sehr ruhigen Phase, nach Möglichkeit schlafend, gemessen. Am Besten geeignet waren hierzu die späten Abend- oder Nachtstunden, da zu diesen Zeitpunkten in der Umgebung der Kinder eine ruhige Atmosphäre herrschte, die sich auch beruhigend auf die kleinen Patienten auswirkte.

Die Frühgeborenen wurden in Inkubatoren, die (noch gesundheitlich beeinträchtigten) Reifgeborenen auf der Intensivstation im Wärmebett und die gesunden Reifgeborenen unter einer Wärmelampe gemessen. Die Messungen wurden zunächst an mehreren Körperstellen ausprobiert, hierzu zählten der Kopf, das Abdomen, die Flanken, die Leisten, das Sternum und die Extremitäten, wobei sich der Bereich der Axilla als am Besten geeignet herausstellte.

Der entsprechende Arm wurde freigemacht und durch die Hand des Untersuchers fixiert, die Kochsalzlösung bei Bedarf aufgetragen und das Handstück des OPS-Gerätes leicht auf die Haut aufgesetzt. Das Anfeuchten der Haut mit Kochsalzlösung verbesserte dabei deutlich die Bildgebung. Dann wurde unter Monitorüberwachung die Tiefenschärfe mit Hilfe der beiden Stellschrauben eingestellt. Bei ausreichender Schärfe des Bildes wurde der Druck auf das Gewebe variiert, bis sich die Blutzell-Geschwindigkeit bei möglichst geringem Druck und dennoch guter Bildqualität nicht mehr änderte. Die Messsonde wurde neben dem zu untersuchenden Kind mit dem geringsten möglichen Haut- Kontakt platziert, um Messungenauigkeiten durch Druck auf die Haut zu vermeiden. Die Messung wurde begonnen, wenn die Kinder sich beruhigt hatten und teils schliefen. Dann wurde der Videorekorder eingeschaltet und die Position des Gerätes im Verlauf der etwa 10- minütigen Aufzeichnung mehrmals verändert, um mehrere Areale in ihrer Durchblutung zu erfassen.

Nach Beendigung der Messung wurde die Aufnahmezeit sowie folgende Parameter dokumentiert: Bei den Frühgeborenen wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), gegebenenfalls entweder durch arterielle Messung (BD, Franklin Lakes, NJ) mit einem Ohmeda Statham transducer (Ohmeda PPD, Liberty Corner, NJ, U.S.A.) oder oszillometrisch bestimmt (Dinamap Vital Data Monitor, Critikon, Norderstedt, Deutschland). Die Herzfrequenz und die Körperkerntemperatur wurden ebenso wie die Inkubatortemperatur per Sonde oberhalb der Leber gemessen und dokumentiert. Der generelle Status der Mikrozirkulation wurde klinisch durch einen semiquantitativen Punktwert (Score, weiter oben beschrieben) bestimmt, bei dem die kapilläre Füllungszeit, das Hautkolorit und die Temperatur der Extremitäten mitberücksichtigt wurden.

Die kapilläre Füllungszeit stellt ein häufig verwendetes klinisches Verfahren dar, bei dem für etwa 5 Sekunden ein moderater Druck auf die Haut ausgeübt und die Zeit bis zum Wiedererscheinen der ursprünglichen Hautfarbe gemessen wird, bei Neugeborenen eignet sich hierzu das Sternum am Besten (11).

2.3.3 Auffinden einer geeigneten Messstelle

Es musste eine Stelle gefunden werden, die leicht zugänglich war und anhand der sich bewegungsarme Bilder erzeugen ließen, um Artefakte in der Bildgebung durch Atembewegung des Kindes oder durch Lanugobehaarung zu verhindern. Hierzu wurden der Kopf der Kinder sowie das Abdomen, der Thorax und die Axillae bzw. inneren Oberarme, die Leisten und Extremitäten der Kinder untersucht.



Abbildung 5: Mit der OPS- Technologie erzeugtes Bild am **1. Lebensstag** eines Reifgeborenen, Messort Axilla

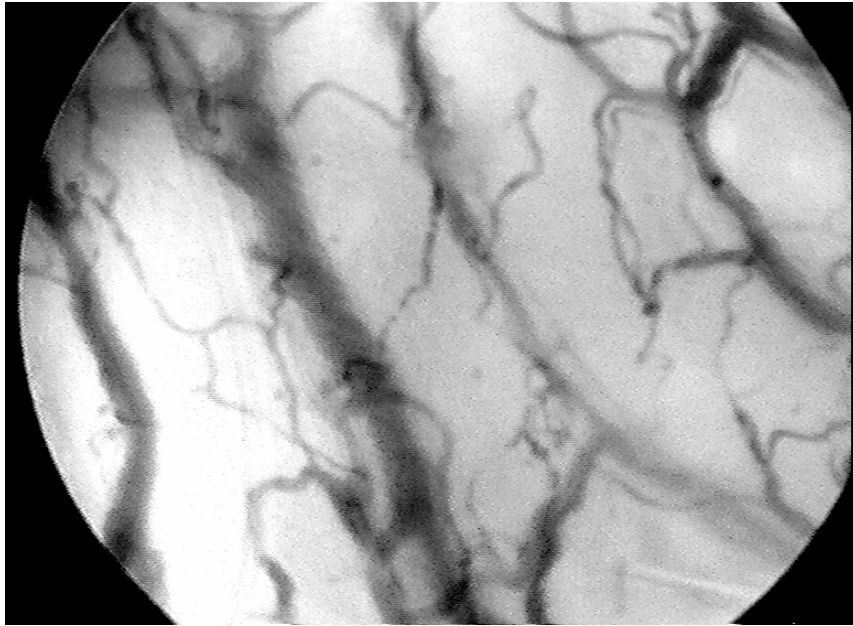


Abbildung 6: Mit der OPS- Technologie erzeugtes Bild am **5. Lebenstag** eines Reifgeborenen, Messort Axilla

3.3.4 Eigenschaften des Cap- Image- Programms

Die durch CYTOSCAN A/R erzeugten Bilder konnten wahlweise mit einer 5- fachen oder 10- fachen Vergrößerung aufgenommen werden. Die 5-fache Vergrößerungsoptik entsprach dabei einer Vergrößerung auf dem Monitor von 326-fach, während die 10-fache Vergrößerungs- Optik auf dem Monitor als 650-fach erschien. Bei unseren Messungen wurde ausschließlich die 5- fache Vergrößerung verwendet.

Die Bilder wurden auf Videocassette aufgezeichnet, die Aufnahmen verblindet und off- line analysiert. Der Gefäßdurchmesser (Diam = Diameter), die Geschwindigkeit der roten Blutbestandteile (RBC Vel = Red Blood Cell Velocity) und die Dichte der Gefäßverteilung (FVD = Functional Vessel Density) wurden daraufhin mit dem etablierten Cap- Image Programm (Dr. Zeintl GmbH, Heidelberg) in möglichst vielen Gefäßen pro Beobachtungseinheit ausgemessen und ausgewertet (93).

3.3.4.1 Bestimmung der Gefäßdurchmesser

Der Gefäßdurchmesser ist der Abstand der Gefäßwände zueinander und wird in μm angegeben. Um den Durchmesser der Gefäße zu bestimmen, wird eines der auf dem Videobildschirm erscheinenden Gefäße ausgewählt und eine Gerade senkrecht zwischen zwei gegenüberliegende äußere Enden des Mikrogefäßes angelegt.

3.3.4.2 Bestimmung der Fliessgeschwindigkeit der Erythrozyten (RBC Vel)

Die Fliessgeschwindigkeit der Erythrozyten wird durch eine Technik namens Line-Shift- Diagramm bestimmt. Diese erfordert eine kurze, etwa 10 Sekunden andauernde Sequenz, die eine möglichst minimale Bildbewegung aufweist.

Das Line- Shift- Diagramm repräsentiert den Raum bezogen auf die Zeit, mit deren Hilfe die Geschwindigkeit von an einer Geraden entlanglaufenden Partikel errechnet werden kann. Die Pixel werden auf einer in der Mitte der Gefäße verlaufenden Geraden horizontal aufgereiht, wobei die Zeit von der X- Achse und der Verlauf der Geraden auf der Y- Achse repräsentiert wird.

Durch rote Blutzellen oder Plasma- Zwischenräume, die auf dieser Geraden entlanglaufen, werden diagonale Streifen im Line- Shift- Diagramm hervorgerufen. Durch die Neigung und die Länge dieser Streifen kann der bisher zurückgelegte Weg eines Objektes auf dieser Geraden in einem bestimmten Zeitraum gemessen und somit dessen Geschwindigkeit berechnet werden. Die Einheit ist $\mu\text{m}/\text{sec}$.

Die maximale Geschwindigkeit, die noch akkurat bestimmt werden kann, liegt in etwa bei 1,5 mm/s. Unter normalen physiologischen Bedingungen kann demnach die Geschwindigkeit in Arteriolen nicht gemessen werden.



Abbildung 7: Messung der erythrozytären Fließgeschwindigkeit in postkapillären Venolen mittels Cap Image. Ausschnitt der sublingualen Mikrozirkulation mit ca. 1 mm Durchmesser, Eichmarke 100 μm . Es werden Messlinien in die Gefäßmitte der postkapillären Venolen eingezeichnet und die Fließgeschwindigkeit mittels Line- Shift- Diagramm ermittelt. Während der Messung werden die Grauwertdaten entlang der Messlinie gelesen. Aus der Dissertationsschrift: Mikrozykulatorisches Monitoring mittels Orthogonal Polarisation Spectral Imaging (OPS) während herzchirurgischer Eingriffe unter extrakorporaler Zirkulation aus Schaudig 2003.

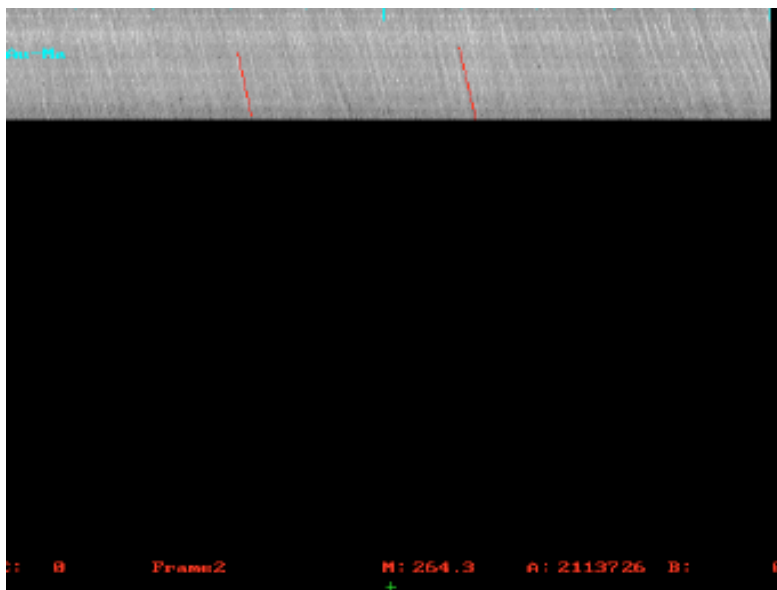


Abbildung 8: Line- Shift- Diagramm

Durch Anklicken dieser schrägen Linien wird automatisch deren Steigung ermittelt (die Y- Achse repräsentiert die Distanz entlang der Linie und die X- Achse entspricht der Zeit) und daraus die Geschwindigkeit in mm/sec berechnet. Bewegt sich während der Messsequenz eine helle Plasmalücke entlang der Messlinie, so wird die Fortbewegung im Diagramm als helle, schräg verlaufende Linie sichtbar. Erythrozyten hingegen werden als dunkle Linien abgebildet. Aus der Dissertationsschrift: Mikrozykulatorisches Monitoring mittels Orthogonal Polarisation Spectral Imaging (OPS) während herzchirurgischer Eingriffe unter extrakorporaler Zirkulation aus Schaudig 2003

3.3.4.3 Bestimmung der funktionellen Gefäßdichte (FVD)

Die funktionelle Gefäßdichte ist definiert als die Länge der durch Erythrozyten (RBC) perfundierten Gefäße pro Beobachtungsfeld und wird in Quadrat-Zentimetern (cm/cm^2) angegeben. Unter Verwendung des Cap- Image Software- Programmes werden die perfundierten Gefäße in einer definierten Beobachtungseinheit nachgezeichnet und die Länge der markierten Gefäße pro Beobachtungs- Einheit zusammengerechnet. Hierbei bezieht sich der Ausdruck „Gefäßdichte“ auf die von roten Blutzellen perfundierten Mikrogefäße. Durch die Bestimmung dieser Einheit können letztendlich Rückschlüsse auf die Qualität der Mikrozirkulation eines Organs als indirektes Maß für die Sauerstoffversorgung gezogen werden. Sie ist somit ein wertvoller Parameter zur Evaluation der Nährstoffversorgung der Zellen.

4 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der statistischen Auswertungssoftware Graph Pad Prism 3.0 für Windows 95 (Graph Pad Software Inc., San Diego CA) durchgeführt. Für den Vergleich der Messung an Tag 1 und 5 innerhalb der zwei Patientengruppen kam der t- Test für ungepaarte Daten oder der Wilcoxon signed rank- Test für ungepaarte Daten (Punktescore und kapilläre Füllungszeit) zur Anwendung. Für einen Vergleich der beiden Gruppen untereinander verwendeten wir den Mann- Whitney nonparametrischen Test. Für Korrelationen wurde der Spearman Rank two- way Test angewendet.

5 Ergebnisse

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 37 Kinder eingeschlossen, davon waren 9 reife normotensive und normotherme Neugeborene (Geburtsgewicht 2100- 4470 g) und 28 Frühgeborene (Geburtsgewicht 550-2070 g / Gestationsalter 24. – 33. Woche). Diese wurden im Zeitraum von 1999 bis 2000 jeweils am 1. und 5. Lebenstag untersucht. Die Parameter systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur wurden jeweils nur bei den Frühgeborenen bestimmt.

Die Gestationsalter lagen zwischen 24. und 41. Schwangerschaftswoche, das Geburtsgewicht zwischen 550g und 2070 g bei den Frühgeborenen und 2100g bis 4470 g bei den Neugeborenen. Die klinischen Daten der Frühgeborenen sowie der Reifgeborenen sind in der **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Klinische Daten der 28 Frühgeborenen und 9 Reifgeborenen (n=37) an Lebenstag 1 und 5: Angaben als Median (mit 95% Konfidenzintervall)

	FG 1. Lebenstag n=28	FG 5. Lebenstag	RG 1. Lebenstag n=9	RG 5. Lebenstag
Gestationsalter [SSW]	30 (28,5 – 30,6)		39,4 (38,5 – 40,4)	
Gewicht [g]	1405 (1200-1544)	1225 (1118-1443)	3258,8 (2840 – 3676,9)	3035 (2736,6 – 3333,5)
Systolischer Blutdruck [mmHg]	46 (44 - 54)	56 (51 – 59)		
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	30 (28 - 36)	34 (32 – 37)		
Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	36 (35 -43)	43 (38 – 44)		
Herzfrequenz [Schläge/min]	148 (141-151)	150 (144-154)		
Score ° (Clinical microcirculation-Score)	0 (0,0 - 0,23)	0 (0,0 – 0,11)	0 (0,0 – 0,0)	0,2 (0,2 – 0,2)
PIP [cmH ₂ O] * °	11,5 (10,0-15,0)	11,0 (8,6-16,5)		
PEEP [cmH ₂ O] * °	3,1 (2,5-5,6)	3,0 (3,0-4,0)		
Körpertemperatur (C°)	37,2 (37,1-37,4)	37,2 (37,1-37,3)		
Inkubatortemperatur [C°]	34,0 (34,0-35,2)	33,3 (33,0-34,2)		
FiO ₂ (%)	0,22 (0,23 – 0,39)	0,21 (0,21 – 0,27)	0,21 (0,21 – 0,21)	0,21 (0,21-0,21)
Kapilläre Füllungszeit (sec)	2 (1,86 – 2,17)	2 (1,95 – 2,05)	2 (2,0 – 2,0)	1,78 (1,49 – 2,07)

¹ FiO₂ = 0,21 wenn keine Beatmung (dann Raumluft)
n = 14 Kinder wurden beatmet.

Es gab bei keiner der Messungen signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 und Tag 5, mit Ausnahme eines signifikanten Gewichtsverlustes und einer niedrigeren Inkubator- Temperatur an Tag 5. Dem klinischen Punktescore zufolge zeigte keines der Kinder eine eingeschränkte Mikrozirkulation und nur 5 der Probanden hatten Blutdrücke, deren Werte an der unteren Grenze ihrer Altersnorm (Gestationsalter) lagen. Zum Zeitpunkt der Messung erhielten 2 der Probanden Katecholamin- Infusionen und 2 von ihnen wurden wegen arterieller Hypotension mit Steroiden behandelt.

5.1 Lokalisation der am besten geeigneten Messstelle

Um Artefakte in der Bildgebung durch Atembewegung des Kindes oder durch Lanugobehaarung zu verhindern, musste eine Stelle gefunden werden, die leicht zugänglich war und anhand der sich bewegungsarme Bilder erzeugen ließen.

Die sublinguale Mukosa als Messstelle – wie in den Versuchen mit erwachsenen Patienten angewandt- musste schon wegen der Größe der optischen Vorrichtung ausscheiden.

Die Stirn, die Schläfen und die Extremitäten der Kinder erwiesen sich wegen der starken Lanugobehaarung besonders bei Frühgeborenen als ungeeignet. Andere Körperteile, wie z.B. die Flanken, Thorax oder das Abdomen sind sehr anfällig für Bewegungsartefakte, zudem sind die Kinder dort sehr berührungsempfindlich und dadurch unruhig. Auch Messungen über dem Sternum waren aufgrund der Atembewegungen des Kindes ungeeignet, da zum Auswerten störungsfreie Videosequenzen von mindestens 10 Sekunden erforderlich sind.

Messungen in der Handinnenfläche konnten wegen der Hautlinien der Leistenhaut nicht verwertet werden, auch hier war eine störungsfreie Auswertung nicht möglich. Es stellte sich heraus, dass die Aufnahmen der Haut in der Axilla sowie der Innenseite des Oberarmes die deutlichsten Bilder erzeugen und sich somit am Besten zur Auswertung eignen.

Eine Lagerung des Kindes auf dem Rücken oder der Seite erwies sich als am Vorteilhaftesten für die Messungen, weil dies auch die geringste Störung des Kindes bedeutete.

Zusammenfassend war es einfacher, qualitativ gute Bilder bei den Frühgeborenen zu erzeugen, da ihre Haut wesentlich dünner und gut durchblutet ist. Bei den reifen Neugeborenen störten regelmäßig vorhandene Hautfalten gelegentlich die einwandfreie Auswertung der Aufzeichnungen.

Das Befeuchten der Haut mit handelsüblicher Kochsalzlösung verbesserte die Bildqualität besonders bei den reifen Neugeborenen, da bei diesen die Verhornung der Haut im Vergleich zu den Frühgeborenen ausgeprägter ist (79).

Tabelle 3: Mögliche Messstellen und Eignung

Stelle	Eignung	Problem
Kopf	ungeeignet	Lanugo
Sublingual	ungeeignet	Sondengröße
Flanke/ Thorax/Abdomen	ungeeignet	Bewegungsartefakte
Hand- Fußsohle	ungeeignet	Hautdicke und Leisten
<i>Sternumspitze</i>	<i>eingeschränkt geeignet</i>	<i>Bewegungsartefakte</i>
Leiste, Bein	ungeeignet	Bewegungsartefakte
<i>Oberarm</i>	<i>geeignet</i>	<i>Bei Zentralisation</i>
<i>Achselhöhle</i>	<i>geeignet</i>	<i>Kinder empfindlich</i>

5.2 Parameter der Mikrozirkulation

Da der Zeitpunkt der Aufnahmen und Darstellung des Kapillarnetzes variierte, wurde eine unterschiedliche Anzahl an Gefäßen bei jedem Probanden und Zeitpunkt ausgewertet. Bei 74 Messungen waren 1.356 Bestimmungen des Gefäßdurchmessers und der Blutzellgeschwindigkeit (mittlerer Wert \pm Standardabw.: 18 ± 12 Gefäße pro Patient und Tag, Bereich/ Umfang 5- 38). Die Dichte der Gefäßverteilung wurde anhand von 5 Bildern pro Patient und Tag berechnet.

Die Blutzellgeschwindigkeit in den Gefäßen mit einem Durchmesser $> 20 \mu\text{m}$ konnte nicht verlässlich bestimmt werden, da diese Gefäße tiefer in der Kutis lagen und somit

unschärfere Bilder erzeugten. Zudem wiesen sie nur sehr kurze gerade verlaufende und somit zur Messung geeignete Strecken auf. Aus diesem Grund wurden die Gefäßdurchmesser und Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeiten in kleineren, gut darstellbaren Gefäßen mit Mikrogefäßdurchmessern von 6 bis 24 μm bestimmt. Die Verteilung der Gefäßdurchmesser ist in **Tabelle 4** dargestellt.

Wie schon zuvor bei den Methoden erwähnt, war die Voraussetzung zur Berechnung der Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeit eine weitgehend beständige bewegungsartefaktfreie Darstellung eines Gefäßes für mindestens 10 Sekunden.

Sehr kleine Gefäße mit einem Durchmesser $< 5\mu\text{m}$ waren in der Regel ungeeignet, da selbst die kleinste Bewegung der in den Verlauf des Gefäßes gelegten Geraden zur Bestimmung der Geschwindigkeit unzuverlässige Messergebnisse erbrachte.

Innerhalb größerer Gefäße verblieb diese Gerade während der Zeit der 10-sekündlichen Messungen zumeist im Gefäß und erbrachte daher zuverlässigere Geschwindigkeitswerte. Aufgrund des noch ungeordneten Verlaufs der Hautgefäße bei den Neugeborenen konnten Hautarteriolen und -venolen nicht eindeutig differenziert werden. Die Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeiten reichten von 150 bis 1100 $\mu\text{m}/\text{s}$ mit einem mittleren Wert von 497 $\mu\text{m}/\text{s}$. Die Variationsbreite der RBC-Geschwindigkeit im jeweiligen Probanden zum gleichen Messzeitpunkt wurde in manchen Fällen mit Unterschieden bis zu 544 $\mu\text{m}/\text{s}$ bei Reifgeborenen und 844 $\mu\text{m}/\text{s}$ bei den Frühgeborenen errechnet.

Zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung wurden die mittleren Unterschiede in der Blutzellgeschwindigkeit mit $524 \pm 157 \mu\text{m}/\text{s}$ bei reifen Neugeborenen und $364 \pm 120 \mu\text{m}$ bei Frühgeborenen mit einem Konfidenzintervall von 446 bis 603 μm für Reifgeborene und 312 bis 416 μm für Frühgeborene berechnet.

Die Varianz- Koeffizienten waren $30 \pm 7 \mu\text{m}/\text{s}$ und $26 \pm 8 \mu\text{m}/\text{s}$ bei Reifgeborenen und 22 ± 8 sowie $19 \pm 8 \mu\text{m}/\text{s}$ bei der Gruppe der Frühgeborenen, jeweils am 1. und 5.

Lebenstag. Bei den reifen Neugeborenen gab es keine Unterschiede bezüglich Gefäßdurchmesser, Gefäßverteilungsdichte oder der Blutzellgeschwindigkeit zwischen Tag 1 und 5 der Messung. Die Dichte der Gefäßverteilung, der Durchmesser und die Blutzellgeschwindigkeit unterschied sich im Mittel nicht bei den Gruppen der Früh- und Reifgeborenen. In der Gruppe der Frühgeborenen gab es am Tag 5 zwar keine Unterschiede bei den Gefäßdurchmessern oder der Dichte der Gefäßverteilung, die

Geschwindigkeit der Blutzellen erwies sich jedoch als signifikant höher ($p=0.01$ Tag 1 vs Tag 5 – Wilcoxon Test).

Der Gefäßdurchmesser und die Verteilungsdichte korrelierten nicht mit den klinischen Parametern, wie z. B. Gestationsalter, Herzfrequenz oder Blutdruck.

Es bestand ebenso kein Zusammenhang zwischen der Temperatur des Inkubators und der Blutzellgeschwindigkeit.

Leukozyten, die sich an den Gefäßwänden entlang bewegten oder als Lücke zwischen den Säulen der roten Blutzellen zu erkennen waren (wie zuvor in der Literatur beschrieben) konnten nur gelegentlich beobachtet werden (16, 86, 88).

Wir konnten weder zwischen den beiden Gruppen der Früh- und reifen Neugeborenen, noch innerhalb dieser Gruppen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten signifikante Unterschiede bezüglich der Gefäßdichte feststellen.

Zum Zeitpunkt der Messung bestand bei keinem der Kinder ein Schock oder eine Hypotension, dennoch wurden zwei der Probanden Katecholamine und weiteren zwei Kindern Cortison zur Blutdruckunterstützung verabreicht. Zur bildhaften Darstellung der Mikrozirkulation verwendeten wir den klinischen Score, dargestellt in **Tabelle 1**. Bei keinem der Kinder konnten wir Zeichen eingeschränkter Mikrozirkulation feststellen.

Tabelle 4: Ergebnisse der ¹⁾ Erythrozytenfliessgeschwindigkeit; ²⁾ Gefäßdurchmesser; ³⁾ Funktionelle Kapillardichte der 28 Frühgeborenen und 9 Reifgeborenen zum Zeitpunkt Tag 1 und 5 nach Geburt - dargestellt als Median mit (95%-Konfidenzintervall)

	Frühgeborene n=28		Reifgeborene n=9	
	Tag 1	Tag 5	Tag 1	Tag 5
RBC Velocity ¹⁾ [µm/sec]	528 * (486-564)	570 * (548-662)	530 (456-586)	531 (456-587)
Diameter ²⁾ [µm]	8,0 (7,9-8,8)	8,0 (7,7-8,6)	8,0 (7,2-8,4)	7,3 (7,0-7,7)
FCD ³⁾ [cm/cm ²]	291 (280-297)	290 (277-296)	271 (241-279)	274 (251-294)

¹⁾ Erythrozytenfliessgeschwindigkeit; ²⁾ Gefäßdurchmesser; ³⁾ Funktionelle Kapillardichte

* p = 0,001 (Tag 1 vs Tag 5)

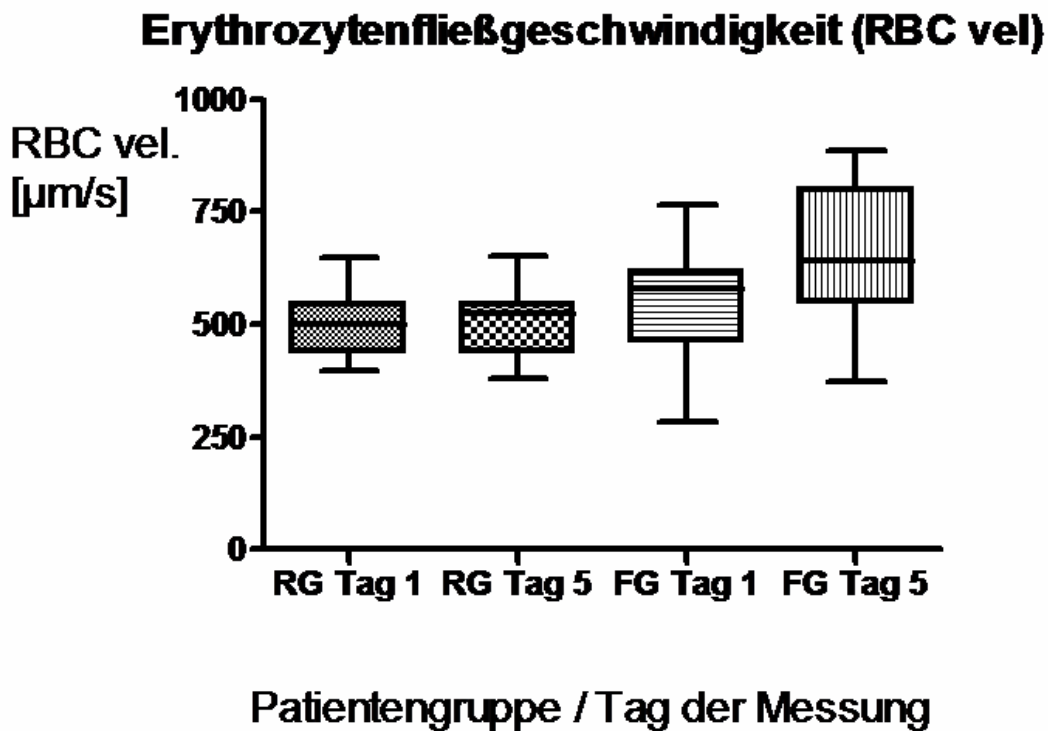


Abbildung 9: Box-and-Whiskers-Plot der RBC Velocity der Früh- und Reifgeborenen an Tag 1 und 5

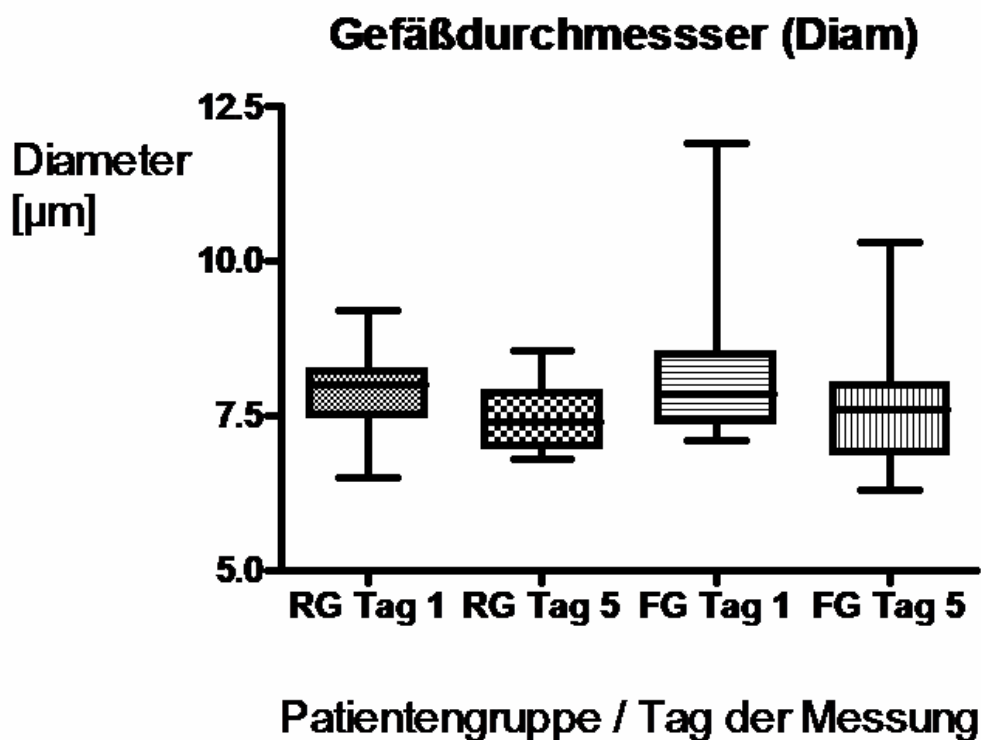


Abbildung 10: Box-and-Whiskers-Plot Diameter der Früh- und Reifgeborenen, Tag 1 und 5

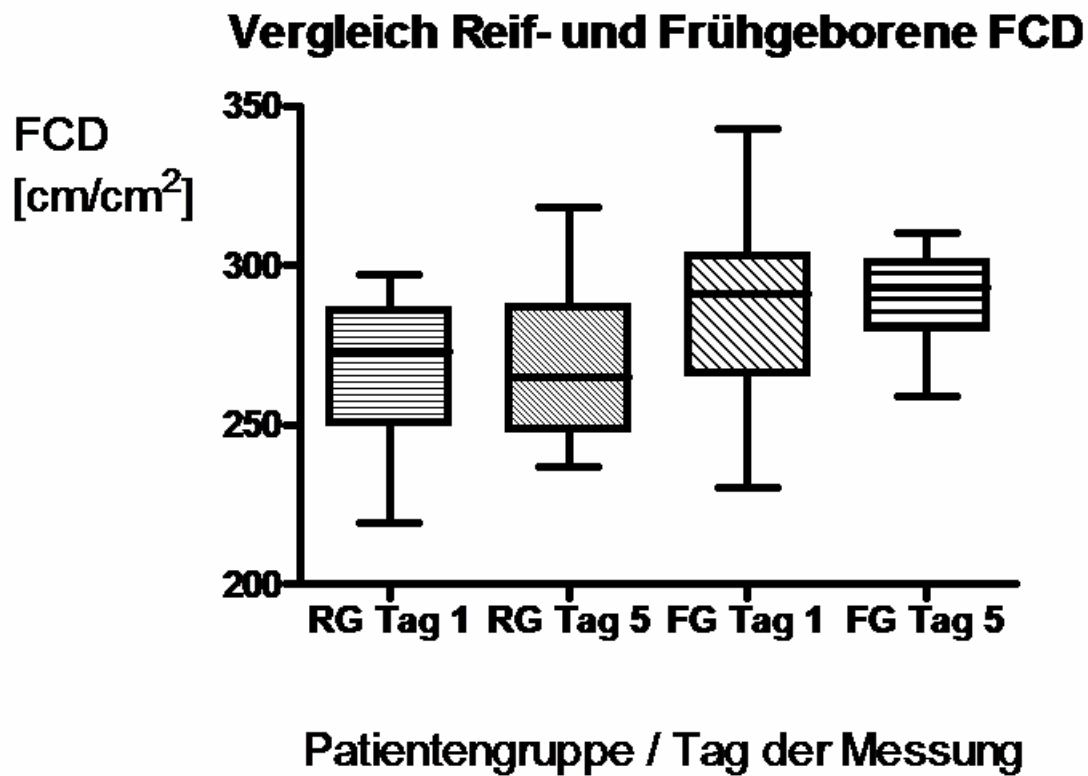


Abbildung 11: Box-and-Whiskers-Plot der funktionellen Kapillardichte der Frühgeborenen (FG) und Reifgeborenen (RG) an Tag 1 und 5

Das Kapillarnetz erschien bei beiden Gruppen an Tag 1 der Messung verglichen mit Tag 5 eher ungeordnet, wie es zuvor in der Literatur schon beschrieben wurde (69). Zur Quantifizierung dieser Veränderung wurde jedoch keine Untersuchung durchgeführt.

6 Diskusssion

6.1 Ergebnisse der Auswertung der Mikrozirkulationsaufnahmen

Mit unserer Studie haben wir gezeigt, dass die mikrozirkulatorischen Parameter der Haut in absoluten Werten bei reifen Neugeborenen und sogar bei Frühgeborenen gemessen werden können. Die handliche Größe des Messinstrumentes macht auch die Verwendung in Inkubatoren möglich. Wir konnten demonstrieren, dass die OPS-Bildgebung neue Perspektiven in der klinischen Überwachung Neu- und Frühgeborener eröffnet. Sie erlaubt einen einfachen, tragbaren Zugang zu einer Vielzahl von Gefäßbetten ohne den Gebrauch bildverstärkender Kontrastmittel.

6.1.1 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten

Es gibt, wie von uns sowie Norman et al. (63) berichtet, keine signifikanten Unterschiede der Blutzellgeschwindigkeiten bei der Messung an unseren Früh- und reifen Neugeborenen im Vergleich zu den Werten, die in der Blutzellgeschwindigkeit des Kapillarblutes im Nagelbett des gesunden Erwachsenen (100-500 $\mu\text{m/s}$) gefunden wurden. Die Menge des Blutflusses in der Peripherie des Neugeborenen wurde mit dem Doppelten des Blutflusses beim Erwachsenen bemessen (91).

Aufgrund früherer Beschreibungen der Morphologie der kutanen Mikrogefäße bei Neugeborenen, bei denen eine eher schlechte Hautdurchblutung gefunden wurde, ist es nahe liegend, dass der höhere periphere Blutfluss beim Neugeborenen die oberflächlichen Hautgefäße über tiefer liegende Gefäßbetten umgeht (60, 69, 77). Dies wiederum setzt einen höheren Gefäßwiderstand in den Kapillaren der Neugeborenen voraus. (63)

Eine 0,4- 0,5 μm dicke endotheliale Oberfläche reduziert das funktionelle Kapillarovolumen. Laut Untersuchungen von Intaglietta et al scheint eine zusätzliche Flüssigkeitsauflage, bestehend aus Plasma, von bis zu 1 μm (0,4- 0,6 μm im Mittel) zwischen den fließenden Erythrozyten und dem Endothel der Kapillarwand vorhanden

zu sein (38). Bei dieser Studie wurde FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)-markiertes Dextran als Kontrastmittel zum Nachweis des Plasmas im Rahmen einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Kapillaren verwendet. Diese Plasmaschicht weist eine Dicke auf, die dem Abstand der Erythrozyten zueinander, (abhängig von deren Geschwindigkeit), entspricht.

Mit der CYTOSCAN A/R- Vorrichtung wird der Gefäß- Durchmesser anhand der Weite der Blutzell- Säulen im Gefäß gemessen. Hierbei kann der wahre anatomische Durchmesser aufgrund der Vernachlässigung dieser nicht darstellbaren Plasmaschicht jedoch möglicherweise unterschätzt werden (34).

So wurden in der Studie von Harris et al (34) identische Gefäße bei einer Messung mittels Intravitalmikroskopie um 4-5 μm größer gemessen als mit der auch von uns verwendeten OPS- Bildgebung.

Der in unserer Studie gelegentlich gemessene Hämatokrit- Wert ging nicht in diese Studie ein, da das Ziel der Untersuchungen primär das Auffinden einer geeigneten Messstelle sowie der native Vergleich der Gefäßdurchmesser und der Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeit der beiden Gruppen am 1. und 5. Lebenstag war.

In einer im Folgenden durchgeführten Studie von Genzel- Boroviczeny et al jedoch korrelierte die Blutzellgeschwindigkeit invers mit dem Hämatokrit (23). Bei den Frühgeborenen in dieser Studie wurde eine signifikante Abnahme des Hämatokrit vom 1. zum 5. Lebenstag, am ehesten bedingt durch iatrogenen Blutverlust, verzeichnet.

Der Hämatokrit- Wert, der bei Neugeborenen regelmäßig erhöht ist, scheint von besonderer Bedeutung für die Perfusion der Hautkapillaren zu sein. Die Untersucher vermuten als Ursache des Widerstandes im Kapillarblutfluss nicht nur den Anstieg der Anzahl der roten Blutzellen, sondern ebenso die Größe der Erythrozyten bei Neugeborenen (63). In einer weiteren Studie fanden Norman et al eine inverse Korrelation zwischen den hohen Hämatokrit- Werten bei den postnatal polyzythämischen Neugeborenen und eine sehr geringe kapilläre Blutzellgeschwindigkeit (110 $\mu\text{m} / \text{s}$) (64). Die kapilläre Blutzellgeschwindigkeit stieg dabei in einem stark nichtlinearen Verhältnis mit einer Reduktion des Hämatokrit als Ergebnis einer Austausch- Transfusion an (210 $\mu\text{m} / \text{s}$, gesunde Kontrollgruppe 300 $\mu\text{m} / \text{s}$).

6.2 Mikrozirkulation der Haut bei Reifgeborenen

Obwohl die Kapillarmikroskopie schon seit 30 Jahren bei Erwachsenen mit einer Mikroangiopathie eingesetzt wird, gibt es nur sehr wenige Veröffentlichungen über deren Einsatz bei Neugeborenen. Die vorliegenden Studien waren begrenzt auf Untersuchungen im Nagelbett bei reifen Neugeborenen in der ersten Lebenswoche (69). Über die Durchmesser der Hautkapillaren bei Neugeborenen existieren bisher nur wenige Veröffentlichungen. Die von uns erhobenen Daten stimmen überein mit den durch Nagelbett- Kapillaroskopie gemessenen Kapillardurchmessern, bei denen Werte zwischen 6 und 15 μm dokumentiert wurden (63).

Bei Erwachsenen, bei denen OPS-Bildgebung sublingual erzeugt werden kann, können größere Gefäße gut dargestellt sowie Arteriolen und Venolen differenziert werden. Beim Neugeborenen liegen Gefäße mit einem Durchmesser über 25-30 μm tiefer in der Dermis eingebettet. Hier können nur jeweils vereinzelte Schlingen in ihrem Verlauf in tiefere Schichten beobachtet werden. Der mittlere Durchmesser der in unserer Studie gemessenen Gefäße betrug etwa 8 μm . Dies entspricht einer Gefäßgröße im unteren Bereich, die eben noch von neonatalen Blutzellen perfundiert werden kann. Messungen der Verformbarkeit und der Geometrie neonataler Erythrozyten haben gezeigt, dass der durchschnittliche neonatale Erythrozyt zylindrische Röhren mit einem inneren Durchmesser von 3,8 μm und mehr durchwandern kann, der durchschnittliche Erythrozyt beim Erwachsenen sogar Röhren mit einem Durchmesser von nur 3,4 μm und höher (73).

Norman et al. bestimmten die Blutzellgeschwindigkeit in den Kapillaren des Nagelbettes reifer Neugeborener am 2. bis 7. Tag nach Geburt. Die im Rahmen dieser Studie bestimmten Werte stimmen im Allgemeinen mit den von uns erhobenen Daten überein, mit einer Spanne von 40 bis 120 $\mu\text{m/s}$ und einem mittleren Wert von $380 \pm 210 \mu\text{m/s}$. Ähnlich wie in unserer Studie, konnte in dieser Untersuchung keine Korrelation zwischen der kapillären Blutzellgeschwindigkeit und der Hauttemperatur sowie des MAD oder des postnatalen Alters gefunden werden.

6.3 Mikrozirkulation der Haut bei Frühgeborenen

Die Frühgeborenen in unserer Studie wiesen signifikant höhere Erythrozyten-Fliessgeschwindigkeiten am 5. Lebenstag im Vergleich zum 1. Lebenstag auf. Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang mit dem postpartal abfallenden Hämatokrit- Wert der Kinder, jedoch war dieser Zusammenhang nicht Gegenstand unserer Studie und wurde demnach nicht weiter untersucht. Norman et al (64) beschrieben bereits 1992 in einer Untersuchung an reifen Neugeborenen mit Polyzythämie nach Austauschtransfusion mit fresh frozen plasma oder Albumin eine eindeutige Zunahme der mit Hilfe von Mikroskopie der Nagelpfalz- Kapillaren gemessenen Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeiten nach Reduktion des Hämatokrits. In weiteren Studien von Genzel et al konnte ebenso ein signifikanter Anstieg der Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeiten bei sinkenden Hämatokritwerten (25) sowie eine Zunahme der Gefäßdichte bereits wenige Stunden nach Transfusionen bei Frühgeborenen (23) festgestellt werden. Auch 24 Stunden nach Transfusion hielten diese Veränderungen an, es waren zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Vormessung sogar nochmals eindeutig höhere Werte für die Gefäßdichte messbar (Ausgangswert 142 cm/cm^2 , 2 Stunden nach Transfusion 185 cm/cm^2 , 24 Stunden nach Transfusion 206 cm/cm^2). Ein Anstieg der Hämoglobinkonzentration um $2,4 \text{ g/dl}$ (entsprechend etwa 29%) bewirkte laut dieser Studie eine signifikante Steigerung der Gefäßdichte bei den Frühgeborenen. Anhand von Studien, die mittels OPS- Bildgebung sowohl im septischen als auch im kardiogenen Schock (17, De Backer et al) durchgeführt wurden, konnte eine deutlich reduzierte Gefäßdichte an der sublingualen Mundschleimhaut beobachtet werden. Aus einer über OPS- Bildgebung gemessenen relativen Abnahme der funktionellen Kapillardichte (FCD) ließe sich in Zukunft möglicherweise die Indikation zu einer Transfusion ableiten.

Aber auch äußere Faktoren wie die Umgebungstemperatur bzw. Inkubatortemperatur können einen Einfluss auf die Mikrozirkulation der Haut, insbesondere bei den Frühgeborenen haben. (26)

All dies lässt die Notwendigkeit einer standardisierten Vorgehensweise und nach Möglichkeit die Ermittlung von Normwerten in weiteren Studien bei Messungen unter

Zuhilfenahme von OPS- Bildgebung vor einer möglichen Anwendung im klinischen Alltag erkennen.

6.4 Vergleich von Reifgeborenen und Frühgeborenen

Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Gruppen der Frühgeborenen und der reifen Neugeborenen bezüglich Gefäßdichte, Gefäßdurchmesser oder Erythrozyten- Fliessgeschwindigkeit nicht festgestellt werden. Die Gruppen der untersuchten Kinder waren jedoch ausnahmslos solche in klinisch stabilem Zustand ohne Hinweis auf eine Infektion oder gar Sepsis.

6.5 Anwendungsmöglichkeiten der Methode im klinischen Alltag

In einer Studie von De Backer et al. wurde die Gefäßdichte und der Blutfluss bei gesunden Probanden und Patienten mit septischem und kardiogenem Schock im Vergleich sublingual gemessen (17).

Dort fand man ein verändertes Perfusionsmuster bei septischem Schock mit deutlich reduzierter Anzahl perfundierter Kapillaren, insbesondere kleiner Gefäße. Ebenso wurde eine vermehrte Anzahl von Gefäßen mit transientem oder nicht vorhandenem Blutfluss beobachtet. Bei Patienten mit kardiogenem Schock war die Kapillardichte vermindert und die Konglomerate der Erythrozyten konnten in den Venolen dargestellt werden. Diese Messungen waren jedoch nur semiquantitativ, da jeweils nur drei horizontale sowie drei vertikale Geraden pro Gesichtsfeld festgesetzt wurden, die die Anzahl der Gefäße bestimmten, die diese Geraden kreuzen. Schaudig et al. berichteten nach Messungen mittels OPS an der sublingualen Mukosa bei Erwachsenen während Herz- Lungen- Maschinenzeit (kardiopulmonaler Bypass- Zeit) über eine Verminderung der funktionellen Kapillardichte und der Blutzellgeschwindigkeit (76).

Veränderungen in der Mikrozirkulation spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines Organversagens. Bisher wurden jedoch in diesem Zusammenhang nur makrozirkulatorische Parameter wie z.B. Blutdruck, Herzzeitvolumen und Sättigung bestimmt. Die kapilläre Füllungszeit ist eine leicht zu bestimmende, jedoch auch

relativ subjektive Messung mit einem schwer zu definierenden Endpunkt. Zudem wird sie signifikant durch Umweltfaktoren beeinflusst. OPS- Bildgebung könnte hierbei neue Perspektiven für die klinische Überwachung bieten, da sie einen leicht zu handhabenden, tragbaren Zugang zu einer Vielzahl von Gefäßbetten darstellt, ohne Bildverstärkung durch Kontrastmittel zu erfordern.

Bei Erwachsenen wurde dieses Verfahren sublingual oder intraoperativ direkt an Organen angewendet (5, 6, 7, 15, 83). So konnte man bisher im Rahmen neurochirurgischer, kardiochirurgischer, transplantationschirurgischer oder unfallchirurgischer Operationen Veränderungen der Mikrozirkulation unter verschiedensten Bedingungen nachweisen (15, 76).

Im Bereich der Diagnostik und des Monitorings von Erkrankungen, die die Mikrozirkulation beeinträchtigen sowie deren Therapie ließe sich die OPS-Bildgebung in Zukunft gut integrieren. Ein Einsatz zum frühzeitigen Erkennen einer Infektion oder Sepsis bei Früh- und Neugeborenen ist denkbar und bereits Gegenstand einer Dissertationsschrift (Kathrin Weidlich 2007) sowie aktueller Studien der Forschungsgruppe um Genzel et al (87).

Im Gegensatz dazu stellt die Laser- Doppler- Flussmessung nur einen semiquantitativen Einblick in die oberflächliche Gewebepерfusion dar. Wegen des relativ hohen Grades an Penetration im Gewebe sind bei dieser Untersuchung nicht nur die Papillargefäße, sondern ebenso arterielle und venöse Gefäße der oberflächlichen und mittleren Hautlagen mit eingeschlossen. Zudem ist die Ausrüstung sperrig und Messungen an Säuglingen in Inkubatoren somit erschwert.

Alternativ stellt die zeitlich versetzte Nahe- Infrarot- Photoplethysmographie aller Voraussicht nach auch eine vielversprechende Technik zur Bestimmung mikrozirkulatorischer Veränderungen dar.

Es beinhaltet eine detailliertere Analyse des in der Pulsoxymetrie angewendeten Signals. Studien von Genzel-Boroviczény et al haben gezeigt, dass die Nahe- Infrarot- Photoplethysmographie als semiquantitative Methode zur Bemessung von Veränderungen in der Mikrozirkulation Frühgeborener mit eingeschränkter Perfusion nach Kolloid- Bolus- Verabreichung eingesetzt werden kann (24). Bis jetzt gibt es

jedoch hierfür weder eine kommerziell erhältliche Messvorrichtung, noch die Möglichkeit des Einsatzes der Standard- Pulsoxymetrie- Vorrichtung.

6.6 Risiken der Anwendung des Verfahrens bei Früh- und Neugeborenen

Unter Verwendung der sehr niedrigen Lichtenergie konnten Schäden an der Haut der Kinder, selbst der Frühgeborenen, ausgeschlossen werden (59).

Da die Lichtquelle aus Kaltlicht besteht und die Haut weder angreift noch erhitzt, kann OPS auch bei extremen Frühgeborenen mit einem Gestationsalter um die 23.-24. Schwangerschaftswoche verwendet werden. Die Untersuchungen wurden von allen Patienten problemlos toleriert.

6.7 Stärken und Limitationen

Unsere Studie ist ein prospektiver Vergleich der Anwendung der OPS-Bildgebung an zwei vergleichbaren Patientengruppen zu jeweils zwei Zeitpunkten nach Geburt.

Die Auswertung der Patientendaten erfolgte verblindet, sodass eine Untersucher-abhängige Beeinflussung unserer Ergebnisse ausgeschlossen werden konnte.

Allerdings konnte aufgrund mangelnder Markierungsmöglichkeit (33) ein direkter Vergleich identischer Gefäßareale eines Patienten zu unterschiedlichen

Messzeitpunkten nicht gewährleistet werden. Eine entsprechend große Datenmenge und Anzahl der Messungen war daher zum Vergleich erforderlich.

Ein entscheidender Aspekt unserer Auswertung war die Entwicklung der beobachteten Parameter über einen Zeitraum von 5 Tagen. Weil Patienten vor dem fünften

Lebenstag entlassen wurden oder verstarben, konnte eine erhebliche Anzahl sowohl an Reifgeborenen wie auch Frühgeborenen nicht in die Auswertung eingeschlossen

werden. Dennoch erreicht unsere Auswertung eine Gesamtzahl an Probanden in beiden Gruppen, die eine sinnvolle Untersuchung unserer Fragestellung ermöglichte.

Momentan sind die Berechnungen sehr zeitraubend, da sie off-line durchgeführt

werden müssen. Dies schränkt die klinische Anwendbarkeit zunächst noch stark ein.

Der Einsatz im klinischen Alltag erfordert jedoch eine standardisierte und

automatisierte Analyse- Routine, die als verlässliche Messung der Gewebeperfusion validiert wurde. Es existiert mittlerweile ein neueres und komfortableres Programm zur Auswertung der Aufzeichnungen (CapiScope®, KK Technologies, UK). Dieses Programm dient als Videobildanalysesystem bei zuvor digitalisierten Aufnahmen mittels der OPS- Technik. Allerdings werden die Auswertungen auch bei diesem Programm noch off- line zeitaufwendig durchgeführt. Aufgrund der verhältnismäßig großen inter- und intraindividuellen Variabilität der Werte konnten bisher keine Normwerte für die Mikrozirkulation ermittelt werden. Eine Einschätzung der Mikrozirkulation kann daher nur in Zusammenschau mit klinischen Befunden individuell im Verlauf getroffen werden.

Zusätzlich ergeben sich Probleme bei der Anwendung durch Bewegungs- und Druckartefakte, die die Auswertung der Bildsequenzen erschwerten.

Unter weiteren Verbesserungen der Anwendbarkeit dieser Untersuchung sind prospektive Auswertungen an größeren Patientenkollektiven wünschenswert.

6.8 Einfluss von Artefakten und Störfaktoren

6.8.1. Beeinflussung der Messungen durch Hautfalten und Lanugobehaarung

Bei den Frühgeborenen sind viele Teilbereiche der Haut, insbesondere die Stirn, die Schläfen und die Extremitäten, mit Lanugobehaarung bedeckt, die die Messungen einschränkten. An Händen und Füßen der Kinder traten bei der Auswertung der Bilder störende Furchungen an den Stellen auf, wo die Hautfalten verliefen. Da man jedoch diese Strukturen gut von den übrigen abgrenzen konnte, gingen die Abschnitte mit Behaarung oder Hautfalten nicht in die Auswertung ein.

6.8.2 Druck-und Bewegungsartefakte

Bei den Untersuchungen war- besonders bei unerfahrenen Untersuchern- bei zu starkem Druck auf die Sonde eine Behinderung des Blutflusses bis zur Stase festzustellen. Dadurch könnte es durch die Kompression möglicherweise zu Fehlern in der Beurteilung der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit und der funktionellen Kapillardichte kommen (59). Bei der off- line- Auswertung waren die Unterschiede

oftmals am laufenden Bild zu erkennen. Mit zunehmender Übung in der Handhabung des Untersuchungsgerätes konnte dieser Störfaktor kontrolliert werden. Dennoch ist das Ausmaß dieser Beeinträchtigung schwer abzuschätzen. Eine Möglichkeit, die Sonde ohne direkten Hautkontakt –eventuell durch eine Halterung- zu platzieren, gibt es bisher nicht. Versuche anderer Untersucher, –wie bei Uhl et al., Thomale et al. und Lindert et al. - das Gerät nach Möglichkeit ohne direkten Kontakt mit dem zu untersuchenden Gewebe zu platzieren, sind in den Inkubatoren vor allem aufgrund der Größe dieser Vorrichtungen nicht praktikabel (55, 83, 85).

Außerdem konnten die Kinder bei Messungen an empfindlichen Stellen wie der Axilla oder der Leisten unruhig werden, so dass Bewegungsartefakte die Qualität der Bilder reduzierte. Zudem wird nach einer Studie von Dollberg et al. die Hautdurchblutung bei Frühgeborenen durch Weinen signifikant gesteigert (18). Messungen an schlafenden Kindern waren demnach mit weniger Artefakten verbunden. Eine ruhige Atmosphäre, vorzugsweise bei Messungen am Abend und nachts, sowie eine angenehme Temperatur der Umgebung und der Untersuchungsvorrichtung sowie der Untersucherhände waren hierbei wichtig. Auch trugen die Vermeidung schneller und hektischer Bewegungen, möglichst wenig Berührung des Kindes während der Untersuchung und ausreichend Zeit für die Untersuchung erheblich zur Minimierung dieses Problems bei. Eine Sedierung der Probanden war in keinem Fall erforderlich.

7 Zusammenfassung

Bei 9 reifen Neugeborenen (Geburtsgewicht 2100- 4470 g) und 28 Frühgeborenen (Geburtsgewicht 550-2070 g / Gestationsalter 24. – 33. Woche) wurde mit der vorgestellten Methode die Geschwindigkeit der roten Blutzellen und der Gefäßdurchmesser sowie die Dichte der Gefäßverteilung im jeweils beobachteten Areal bestimmt.

Die Auswertung der Messergebnisse wurde off- line mit dem Cap- Image- Programm durchgeführt. Im Bereich des inneren Oberarmes und der Axilla wurden jeweils am 1. und 5. Lebenstag Gefäße gemessen und auf Video aufgenommen. Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur und Temperatur des Inkubators wurden während der Messung notiert.

Der Gefäßdurchmesser rangierte von 6 bis 24 μm , die Gefäßdichte von 219 bis 340 cm / cm^2 ohne nennenswerte Veränderung von 1. bis 5. Lebenstag und ohne Unterschiede zwischen den beiden Gruppen Frühgeborene und reife Neugeborene.

Die Geschwindigkeit der Erythrozyten nahm bei der Gruppe der Frühgeborenen vom 1. Lebenstag [Median 528 $\mu\text{m} / \text{s}$, 95% Konfidenzintervall (CI) 486- 564 $\mu\text{m} / \text{s}$] bis 5. Lebenstag [Median 570 $\mu\text{m} / \text{s}$; 95% CI 548- 662 $\mu\text{m} / \text{s}$; $p = 0,001$] zu.

Diese neue Technologie kann zur Erfassung quantitativer Veränderungen der Mikrozirkulation eingesetzt werden und stellt somit ein nichtinvasives Verfahren zur Bestimmung der Gewebepfusion bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen dar. Somit besteht die Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung mikrozirkulatorischer Veränderungen wie z.B. im Rahmen einer Sepsis.

Zusammenfassend besteht unsere Aussage darin, dass bei Frühgeborenen die transdermale Anwendung der OPS- Bildgebung nichtinvasiv quantitative Aussagen über mikrovaskulären Durchmesser und Blutzellgeschwindigkeit liefert. Die OPS- Bildgebung macht eine direkte Untersuchung der Blutzell- Rheologie *in vivo* ohne die Notwendigkeit von Blutentnahmen umsetzbar und ermöglicht so gegebenenfalls die klinische Überwachung einer beginnenden Sepsis oder einer mikrozirkulatorischen

Reaktion auf durchgeführte Therapiemaßnahmen, z.B. Transfusionen oder Katecholamingaben. Dies macht es zu einem wertvollen klinischen Hilfsmittel. Der Einsatz im klinischen Alltag erfordert jedoch eine standardisierte und automatisierte Analyse- Routine, die als verlässliche Messung der Gewebepерfusion validiert wurde. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Berechnungen sehr zeitraubend, da sie off-line durchgeführt werden müssen. Dies schränkt die klinische Anwendbarkeit zunächst noch stark ein. Zusätzlich ergeben sich Probleme bei der Anwendung durch Bewegungs- und Druckartefakte, die die Auswertung der Bildsequenzen erschweren. Die Weiterentwicklung von OPS Imaging und die Vermeidung von systematischen Fehlern macht OPS Imaging zu einer zukunftssträchtigen Technologie.

8 Literaturverzeichnis

1. Achen MG, Stacker SA: The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Path* 1998; 79:255-265.
2. Bahmer FA, Bojanowsky A, Boonen H, Froesewitter U, Gribig P, Grimmel M et al: *Duale Reihe Dermatologie* 1998; 4. Auflage, Hrsg. Jung EG.
3. Beinder E, Trojan A, Bucher HU, Huch A, Huch R: Control of Skin Blood Flow in Pre- and Full- Term Infants. *Biol Neonate* 1994; 65:7 – 15
4. Bernardi L, Radaelli A, Solda PL, Coats AJS, Reeder M, Calciati A, et al: Autonomic control of skin microvessels: assessment by power spectrum of photoplethysmographic waves. *Clinical Science* 1996; 90:345-355.
5. Biberthaler P, Langer S: Comparison of the new OPS imaging technique with intravital microscopy: analysis of the colon microcirculation: *Eur Surg Res* 2002; 34:124-128.
6. Biberthaler P, Langer S, Luchting B, Khandoga A, Messmer K: In Vivo Assessment of Colon Microcirculation: Comparison Of The New OPS imaging Technique With Intravital Microscopy. *Eur J Med Res* 2001; 6:525-534.
7. Boehm D, Christ F, Harris AG; Reichenspurner H, Reichart B, Messmer K: First application of intravital microscopy on the beating heart using OPS imaging. *J Vasc Res* 2000; 37: 23
8. Bollinger A, Butti P, Barras JP, Trachsler H, Siegenthaler W: Velocity of red blood cells in human nailfold capillaries measured by a television microscopy technique. *Vasa* 1974; 4:163-164.
9. Bongard O, Fagrell B: Variations in laser Doppler flux and flow motion patterns in the dorsal skin of the human foot. *Microvasc Res* 1990; 39:212-22.
10. Brazy J E: Cerebral oxygen monitoring with near infrared spectroscopy: clinical application to neonates. *J Clin Monit* 1991; 7 (4): 325-334
11. Bumke K, Maconochie I: Paediatric capillary refill times. *Trauma* 2001; 3:217-220.

12. Bussau LJ, Delaney PM, Papworth GD, Barkla DH, King RG: Fibre optic confocal imaging (FOCI) of keratinocytes, blood vessels and nerves in hairless mouse skin in vivo. *J Anat* 1998; 192:187-194.
13. Carpentier PH: New Techniques for Clinical Assessment of the Peripheral Microcirculation. *Drugs* 1999; 58:17-22.
14. Christ F, Bauer A, Brügger D: Different optical methods for clinical monitoring of the microcirculation. *Eur Surg Res* 2002; 34:145-151.
15. Christ F, Genzel-Boroviczény O, Schaudig S, Niklas M, Schiessler C, Strötgen J, Eifert S, Reichenspurner H, Harris AG and Messmer K: Monitoring of the Microcirculation in Cardiac Surgery and Neonates using Orthogonal Polarisation Spectral Imaging. A New Tool for the Observation and Measurement of the Human Microcirculation Research. *Progr Appl Microcirc.* Basel, Karger 2000; 24: 82- 93.
16. Christ F, Schaudig S, Schiessler C, Harris AG, Reichenspurner H, Seifert S et al: First visualisation of microvessels and rolling leukocytes during cardiac surgery in man using OPS imaging. *Anesthesiology* 2000; 92:632
17. De Backer D, Creteur J, Vincent JL: Use of Orthogonal Polarization Spectral Imaging in Intensive Care. *Prog Appl Microcirc:* Basel, Karger 2000; 24:104-109
18. Dollberg S, Atherton H, Hoath S: Changes in skin blood flow over the foot with warming of the contralateral heel. *Acta Paediatr* 1998; 87:416-418
19. Fagrell B, Bollinger A: Clinical Capillaroscopy: A guide to its use in clinical research and practice, Seattle, Washington, Hogrefe & Huber 1990
20. Fagrell B, Rosen L, Eriksson SE: Comparison between a New Computerized and an Analogue Videophotometric, Cross- Correlation Technique for Measuring Skin Capillary Blood Cell Velocity in Humans. *Int J Microcirc* 1994; 14: 133-138
21. Fagrell B: Advances in microcirculation network evaluation: an update. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15:34-40.
22. Fagrell B, Intaglietta M: Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine. *J Int Med* 1997; 241: 349- 362
23. Genzel-Boroviczény O, Christ F, Glas V, , Blood Transfusion Increases Functional Capillary Density in the Skin of Anemic Preterm Infants, *Pediatr Res* 2004 ; 56 (5): 751-755

24. Genzel-Boroviczény O, Müller C, Christ F: Assessment of Microcirculation in VLBW Infants by Near Infra Red and Red Photoplethysmography. *Pediatr Res* 2000; 47:399.
25. Genzel-Boroviczény O, Strötgen J, Harris AG, Messmer K, Christ F: Orthogonal Polarization Spectral Imaging (OPS): A Novel Method to Measure the Microcirculation in Term and Preterm Infants Transcutaneously. *Pediatr Res* 2002; 51: 386-391
26. Genzel-Boroviczény O, Seidl T, Rieger- Fackeldey E, Abicht J, Christ F: Impaired Microvascular Perfusion Improves With Increased Incubator Temperature in Preterm Infants. *Pediatr Res* 2007; 61 (2): 239-242.
27. Gretz JE, Duling BR: Measurement uncertainties associated with the use of brightfield and fluorescence microscopy in the microcirculation. *Microvasc Res* 1995; 49: 134-40.
28. Groner W, Winkelman JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG: Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999; 5:1209-1212
29. Hales JR, Roberts RG, Westerman RA, Stephens FR, Fawcett AA: Evidence for skin microvascular compartmentalization by laser- Doppler and photoplethysmographic techniques. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993; 12: 99-104
30. Hardman MJ, Moore L, Ferguson MWJ, Byrne C: Barrier Formation in the Human Fetus is Patterned. *J Invest Dermatol* 1999; 113 (6): 1106-1113
31. Harris AG, Hecht R, Peer F, D.Nolte, Messmer K: An Improved Intravital Microscopy System. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997; 17: 322-327.
32. Harris AG, Langer S, Messmer K: The Study of the Microcirculation using Orthogonal Polarization Spectral Imaging, *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 2000; 705-714.
33. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K: Quantitative Analysis of Orthogonal Polarization Spectral Images: Validation in the Hamster Dorsal Skinfold Chamber. In: Messmer K (ed) *Progr Appl Microcirc*. Basel, Karger 2000; 24: 21-31

34. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K: The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. *J Vasc Res* 2000; 37:469-476
35. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K: Validation of OPS imaging for microvascular measurements during isovolumic hemodilution and low hematocrits: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1502- H1509
36. Harrison MW, Connell RS, Campbell JR, Webb MC: Microcirculatory changes in the gastrointestinal tract of the hypoxic puppy: an electron microscope study. *J Pediatr Surg* 1975; 10:599-608
37. Hoshi Y, Tamura M: Measurement of hemoglobin flow and blood flow by nearinfrared spectroscopy. *J Appl Physiol* 1993; 75(4): 1884-1889
38. Intaglietta M, Hammersen F: Measurement of diameter in microvascular studies. *Microcirculatory Technology*, Orlando, Academic Press 1986; 137-148.
39. Jahnukainen T, Lindquist A, Jalonen J, Kero P, Välimäki I: Reactivity of skin blood flow and heart rate to thermal stimulation in infants during the first postnatal days and after a two- month follow-up. *Acta Paediatr* 1996; 85 (6): 733-738
40. Jahnukainen T, Lindquist A, Jalonen J, Kero P, Välimäki I: Responsiveness of cutaneous vasculature to thermal stimulation during phototherapy in neonatal jaundice. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 757- 760
41. Johnson CL, Holbrook KA: Development of Human Embryonic and Fetal Dermal Vasculature. *J Invest Dermatol* 1989; 93 (2): 10 S- 17S
42. Jöbsis F: Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters: *Science* 1977; 198: 1264-1267
43. Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH: Development of Skin Barrier Function in Premature Infants. *J Invest Dermatol* 1998; 111:320-326
44. Klyszcz T, Hahn M, Rassner G, Junger M: The technical construction of a computer-supported measuring unit for in-vivo capillary pressure measurement in human nail fold capillaries. *Biomed Tech* 1997; 42:310-318

45. Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H: Cap image-a newly developed computer-aided videoframe analysis system for dynamic capillaroscopy. *Biomed Technik* 1997; 42: 168-75.
46. Kroth J, Weidlich K, Hiedl S, Nussbaum C, Christ F, Genzel- Boroviczény O: Functional vessel density in the first month of life in preterm neonates. *Pediatr Res* 2008; 64 (5): 567-571
47. Laemmel E, Tdayoni R, Sinitsina I, Boczkowski J, Vicaut E, , Using Orthogonal Polarization Spectral Imaging for the Experimental Study of Microcirculation: Comparisons with Intravital Microscopy. *Progr Appl Microcirc. Basel, Karger* 2000; 24: 50-60
48. Langer S, Born F, Hatz R, Biberthaler P, Messmer K: Orthogonal polarization spectral imaging versus intravital fluorescent microscopy for microvascular studies in wounds. *Ann Plast Surg* 2002; 48: 646-653
49. Langer S, Harris A G, Biberthaler P, von Dobschütz E, Messmer K, , Orthogonal Polarization Spectral Imaging as a tool fort he assessment of hepatic microcirculation: A validation study. *Transplantation* 2001; 71: 1249-1256
50. Langer S, Hatz R, Harris A G, Hernandez-Richter T, Maiwald G, Messmer K: Assessing the microcirculion in a burnt wound by use of OPS imaging: *Eur J Med Res* 2001; 6: 231-234
51. Langer S, von Dobschütz E, Harris A G, Krombach F, Messmer K: Validation of the Orthogonal Polarization Spectral Imaging Technique on Solid Organs. *Progr Appl Microcirc. Basel, Karger* 2000; 24: 32- 46
52. Linderkamp O, Stadler AA, Zilow EP: Blood Viscosity and Optimal Hematokrit in Preterm and Full- Term Neonates in 50- to 500 µm Tubes. *Pediatr Res* 1992; 32: 97-102
53. Linderkamp O, Strohhacker I, Versmold HT, Klose H, Riegel KP, Betke K: Peripheral Circulation in the Newborn: Interaction of Peripheral Blood Flow, Blood Pressure, Blood Volume, and Blood Viscosity. *Eur J Pediatr* 1978; 129:73-81
54. Linderkamp O, Versmold HT, Riegel KP, Betke K: Contributions of red cells and plasma to blood viscosity in preterm and full term infants and adults. *Pediatrics* 1984; 74: 45-51
55. Lindert J, Werner J, Redlin M, Kuppe H, Habazettl H, Pries A R: OPS imaging of human microcirculation: a short technical report: *J Vasc Res* 2002; 39: 368-372

56. Martin H, Norman M: Skin microcirculation before and after local warming in infants delivered vaginally or by caesarean section. *Acta Paediatr* 1997; 86: 261-267
57. Mathura KR, Bouma G J, Ince C: Abnormal microcirculation in brain tumors during surgery. *Lancet* 2001; 358: 1698-1699
58. Mathura KR, Ince C: First Clinical use of Orthogonal Polarization Spectral Imaging. *Progr Appl Microcirc. Basel, Karger* 2000; 24: 94-101
59. Mathura KR, Vollebregt KC, Boer K, De Graaff JC, Ubbink DT, Ince C: Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. *J Appl Physiol* 2001; 91: 74-78
60. Mayer K: Observation on the capillaries of the normal infant. *Am J Dis Child* 1921; 22: 381-387
61. Nadeau R G, Groner W: The role of a new noninvasive imaging technology in the diagnosis of anemia. *J Nutr* 2001; 131: 1610S-1614S
62. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K: Functional capillary density: An indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15:244-249
63. Norman M, Herin P, Fagrell B, Zetterström R: Capillary blood cell velocity in full-term infants as determined in skin by videophotometric microscopy. *Pediatr Res* 1988; 23:585-588
64. Norman M, Fagrell B, Herin P: Effects of neonatal polycythemia and hemodilution on capillary perfusion. *J Pediatr* 1992; 121:103-108
65. Norman M, Herin P, Fagrell B: An evaluation of skin capillary blood flow determinations in neonates using a computerized videophotometric method. *Microvasc Res* 1992; 43:276-284
66. Norman M, Fagrell B, Herin P: Skin microcirculation in neonatal polycythaemia and effects of haemodilution. Interaction between haematocrit, vasomotor activity and perfusion. *Acta Paediatr* 1993; 82:672-677
67. Norman M, Martin H, Herin P: Biological zero in laser Doppler perfusion measurements: studies in neonates. *Acta Paediatr* 1995; 84: 457- 459

68. Pasyk KA, Thomas SV, Hassett CA, Cherry GW, Faller R: Regional Differences in Capillary Density of the Normal Human Dermis. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83 (6): 939- 945
69. Perera P, Kurban AK, Ryan TJ: The development of the cutaneous microvascular system in the newborn. *Br J Dermatol* 1970; 82 (5):86-91
70. Pohl U, De Witt C, Gloe T: Large arterioles in the control of blood flow: Role of endothelium- dependent dilation. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 505-510
71. Pöschl J M B, Weiss T, Fallahi F, Linderkamp O: Reactive hyperemia of skin microcirculation in septic neonates. *Acta Paediatr* 1994; 83: 808-811
72. Radjadhyaksha M, Esterowitz D, Webb R H, Anderson R R: In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 946-952
73. Ruef P, Böhler T, Linderkamp O: Deformability and Volume of Neonatal and Adult Leucocytes. *Pediatr Res* 1991; 29 (2): 128-132
74. Ryan TJ: Development of the Cutaneous Circulation. *Pathophysiology of the Fetus and Neonate*. WB Saunders, Philadelphia 1998; 752-761
75. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors K E, Tuma R F: Intravital fluorescence microscopy : impact of light- induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 505-513
76. Schaudig S, Schiessler C, Harris AG, Reichenspurner HC, Messmer K, Christ F: Intravital microscopy in humans following circulatory arrest for surgery in the ascending aorta. *J Vasc Research* 2001; 38:502
77. Schwalm H: Die Hautkapillaren bei Neugeborenen. *Arch Kinderheilkd* 1934; 103:129-137
78. Slaaf DW, Tangelder GJ, Reneman RS, Jager K, Bollinger A: A Versatile Incident Illuminator for Intravital Microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1987; 6:391-397

79. Smith LT, Holbrook KA: Embryogenesis of the Dermis in Human Skin. *Pediatr Dermatol* 1986; 3: 271-280
80. Stadler A, Linderkamp O: Flow Behavior of Neonatal and Adult Erythrocytes in Narrow Capillaries. *Microvasc Res* 1989; 37: 267-279
81. Steinbauer M, Harris A G, Abels C, Messmer K: Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbeck`s Arch Surg* 2000; 385: 290-298
82. Stern M D: In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975; 254: 56-58
83. Thomale U W, Schaser K D, Unterberg A W, Stover J F: Visualization of rat pial microcirculation using the novel orthogonal polarized spectral (OPS) imaging after brain injury. *J Neurosci Methods* 2001; 108: 85-90
84. Tonnesen MG, Jenkins D, Siegal SL, Lee LA, Huff JC, Clark RAF: Expression of Fibronectin, Laminin, and Factor VIII- related Antigen During Development of the Human Cutaneous Microvasculature. *J Invest Dermatol* 1985; 85 (6): 564- 568
85. Uhl E, Lehmberg J, Steiger HJ, Messmer K: Intraoperative Observation of Human Cerebral Microcirculation. *Progr Appl Microcirc. Basel, Karger* 2000; 24: 72-81
86. Vink H, Duling BR: Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996; 79:581-589
87. Weidlich K, Kroth J, Nussbaum C, Hiedl S, Bauer A, Christ F, Genzel-Boroviczény O: Changes in microcirculation as early markers for infection in preterm infants- an observational study. *Pediatr Res* 2009; 66 (4): 461-465
88. Winkelmann JW: Noninvasive Blood Cell Measurements by Imaging of the Microcirculation. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 479-483
89. Wodey E, Pladys P, Bétrémieux P, Kerebel C, Ecoffey C: Capillary refilling time and hemodynamics in neonates: A Doppler echokardiographic evaluation. *Crit Care Med* 1998; 26 (8) :1437-1440

90. Wolf S, Arend O, Schulte K, Ittel T H, Reim M: Quantification of retinal capillary density and flow velocity in patients with essential hypertension: Hypertension 1994; 23: 464-467
91. Wu PYK, Wong WH, Guerra G, Miranda R, Godoy RR, Preston B, Schoentgen S, Levan NE: Peripheral blood flow in the neonate. 1. Changes in total, skin and muscle blood flow with gestational and postnatal age. Pediatr Res 1980; 14:1374-1378
92. Yogeshvar N. Kalia, Lourdes B. Nonato Carolin H. Lund, Richard H. Guy: Development of skin barrier function in premature infants. J invest Dermatol 1998; 111:320-326,
93. Zeintl H, Tompkins WR, Messmer K, Intaglietta M: Analyse stehender und bewegter Videobilder in der klinischen Mikrozirkulationsforschung. Methoden der klinischen Kapillaroskopie. Basel, Karger 1986; 1-10

9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des OPS- Gerätes	18
Abbildung 2: Einverständniserklärung	26
Abbildung 3: Messgerät Cytoscan A/R mit Basiseinheit und Haltevorrichtung für die OPS Imaging- Sonde sowie eine externe Lichtquelle (weiß) aus Langer et al., 2000 Figure 4	28
Abbildung 4: Frühgeborenes 24 + 3 Schwangerschaftswoche am ersten Lebenstag bei einer Messung (Geburtsgewicht 550 g)	29
Abbildung 5: Mit der OPS- Technologie erzeugtes Bild am 1. Lebenstag eines Reifgeborenen, Messort Axilla	31
Abbildung 6: Mit der OPS- Technologie erzeugtes Bild am 5. Lebenstag eines Reifgeborenen, Messort Axilla	32
Abbildung 7: Messung der erythrozytären Fliessgeschwindigkeit in postkapillären Venolen mittels Cap Image	34
Abbildung 8: Line- Shift- Diagramm Aus der Dissertationsschrift Schaudig: Mikrozirkulatorisches Monitoring mittels Orthogonal Polarisation Spectral Imaging (OPS) während herzchirurgischer Eingriffe unter extrakorporaler Zirkulation	34
Abbildung 9: RBC Velocity der Reif- und Frühgeborenen an Tag 1 und 5	43
Abbildung 10: Diameter der Reif- und Frühgeborenen an Tag 1 und 5	43
Abbildung 11: Funktionelle Kapillardichte der Reif- und Frühgeborenen an Tag 1 und 5	44

Tabelle 1: Das Ausmaß der Mikrozirkulation, Scoresystem (Genzel et al.)	23
Tabelle 2: Klinische Daten der 28 Frühgeborenen und 9 Reifgeborenen (n=37) an Lebenstag 1 und 5: Angaben als Median mit (95% Konfidenzintervall)	37
Tabelle 3: Mögliche Messstellen und Eignung	39
Tabelle 4: Ergebnisse der ¹⁾ Erythrozytenfliessgeschwindigkeit; ²⁾ Gefäßdurchmesser; ³⁾ Funktionelle Kapillardichte der 28 Frühgeborenen und 9 Reifgeborenen zum Zeitpunkt Tag 1 und 5 nach Geburt - dargestellt als Median mit (95%- Konfidenzintervall)	42

10 Danksagung

Für Ihre Unterstützung und Mithilfe möchte ich all jenen danken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Professor Dr. Orsolya Genzel-Boroviczény für die Aufnahme in ihre Forschungsgruppe sowie für ihre fachliche Anleitung und motivierende Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Christ aus der Klinik für Anästhesiologie am Klinikum Großhadern für die Bereitstellung der Messvorrichtung und die Hilfestellung danken. Für die Möglichkeit der Auswertung dieser Studie am Institut für Chirurgische Forschung gebührt Herrn Prof. Dr. mult. hc. K. Messmer und für die dortige Unterstützung Herrn Dr. Anthony Harris Dank.

Ebenso möchte ich mich bei den Ärzten und Schwestern der I 10 bedanken, die mich in meiner Arbeit wesentlich unterstützt haben. Danke an alle Eltern der kleinen Patienten, die bereit waren, mir ihre Kinder anzuvertrauen. Schließlich danke ich meiner Familie, die mir während des gesamten Studiums und darüber hinaus mit unermüdlicher Geduld und Vertrauen zur Seite stand.